

# **PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM**

Biológiai Doktori Iskola

Összehasonlító Neurobiológia Ph.D. Program

## **A fejlődő és felnőtt nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) táplálkozási rendszerének szerotonerg szabályozása**

*PhD értekezés*

**Balog Gábor**

Témavezető:

**Dr. Elekes Károly**

a biológia tudomány doktora

**PÉCS, 2011**



# TARTALOM

<b>1. Bevezetés</b>	6
<b>2. Irodalmi áttekintés</b>	9
2.1. A szerotonin (5-HT) bioszintézise és biotranszformációja	9
2.2. Az 5-HT előfordulása és szerepe a gerincesek idegrendszerében	13
2.3. Az 5-HT előfordulása és szerepe a gerinctelenek idegrendszerében	17
2.4. Az 5-HT előfordulása és szerepe a puhatestűek idegrendszerében	20
2.5. Az 5-HT szerepe a <i>Lymnaea stagnalis</i> táplálkozásának szabályozásában	24
2.6. Az 5-HT receptorok típusai	28
2.7. A <i>Lymnaea stagnalis</i> egyedfejlődése	33
<b>3. Célkitűzések</b>	35
<b>4. Anyagok és módszerek</b>	36
4.1. Kísérleti állatok	36
4.2. Immunhisztokémia	36
4.2.1. Preparálás és szövet előkészítés	36
4.2.2. Fixálók	37
4.2.3. 5-HT immuncitokémia	37
4.2.3.1. Epifluoreszcens immunhisztokémia	37
4.2.3.2. Lézer konfokális immunhisztokémia	38
4.2.3.3. Korrelatív fény- és elektronmikroszkópos immunhisztokémia	38
4.2.3.4. Kontroll kísérletek, specificitás vizsgálatok	39
4.3. Biokémiai vizsgálatok	40
4.3.1. HPLC technika	40
4.3.2. Az 5-HT felvétel mérése	40
4.3.3. Az 5-HT felszabadulás mérése	41
4.3.4. Ligand kötődés vizsgálata membránpreparátumokon	41
4.3.5. Adenilát cikláz aktivitás mérése	42
4.4. Farmakológiai vizsgálatok	42

<b>5. Eredmények</b>	44
<b>5.1. A szerotonerg innerváció kémiai-neuroanatómiája és ultrastruktúrája <i>Lymnaea</i> pofaizomzatában</b>	44
<b>5.1.1. Az 5-HT-immunreaktív innerváció szerveződése embrionális és juvenilis csigák pofaizomzatában</b>	44
<b>5.1.2. Az 5-HT-immunreaktív innerváció szerveződése a felnőtt pofaizomzatban</b>	46
<b>5.1.3. A pofaizomzat és az ideg-izom kapcsolatok általános ultrastruktúrája embrionális és juvenilis korú <i>Lymnaea</i>-ban</b>	54
<b>5.1.4. Az 5-HT-immunreaktív ideg-izom kapcsolatok ultrastruktúrális szerveződése a pofaizomzat maturációja során</b>	56
<b>5.2. A pofaizomzat szerotonerg innervációjának biokémiai jellemzése</b>	66
<b>5.2.1. A pofaizomzat 5-HT tartalma a fejlődő <i>Lymnaea</i>-ban</b>	66
<b>5.2.2. 5-HT felvétel és leadás a pofaizomzatban</b>	67
<b>5.2.3. [<sup>3</sup>H]-5-HT kötődés jellemzése a pofaizomzatban</b>	69
<b>5.2.4. Adenilát cikláz aktivitás a pofaizomzatban</b>	70
<b>5.3. A táplálkozásban részt vevő 5-HT receptorok <i>in vivo</i> fiziológiai-farmakológia jellemzése</b>	71
<b>6. Az eredmények megvitatása</b>	75
<b>6.1. A szerotonerg rendszer fejlődése a <i>Lymnaea stagnalis</i> pofaizomzatában</b>	75
<b>6.2. Az ideg-izom kapcsolatok ultrastruktúrája</b>	80
<b>6.3. A pofaizomzat szerotonerg szabályozásáért felelős receptorok azonosítása</b>	83
<b>7. Összefoglalás</b>	88
<b>8. Summary</b>	90
<b>9. Közlemények jegyzéke</b>	92
<b>9.1. A disszertáció alapjául szolgáló publikációk</b>	92
<b>9.2. A disszertációhoz kapcsolódó konferencia előadások, poszterek</b>	92
<b>9.3. Egyéb konferencia előadások</b>	93
<b>10. Idézett irodalom</b>	94
<b>11. Köszönetnyilvánítás</b>	110



## A SZÖVEGBEN ELŐFORDULÓ RÖVIDÍTÉSEK

**ABC:** avidin-biotin-komplex

**AC:** adenilát cikláz

**ACh:** Acetil-kolin

**5-CT:** 5-karboxiamidotriptamin

**5-HIAA:** 5-hidroxi-indol-ecetsav

**5-HT:** 5- hidroxitriptamin, szerotonin

**5-HT-IR:** szerotonin immunreaktív

**5-HTP:** 5-hidroxi-triptofán

**ATP:** adenzin trifoszfát

**CGC:** cerebrális óriás neuron (cerebral giant cell)

**COMT:** katekol-O-metil-transzferáz

**CPG:** központi mintázat generátor (central pattern generator)

**cAMP:** ciklikus adenzin monofoszfát

**DAB:** 3, 3-diaminobenzidin tetrahidroklorid

**DMT:** dimetil-triptamin

**ER:** endoplazmatikus retikulum

**FITC:** fluoreszcein izotiocianát

**HPLC:** magasnyomású folyadékkromatográfia (High Pressure Liquid Chromatography)

**HRP:** tormaperoxidáz (Horse Radish Peroxidase)

**IgG:** immunoglobulin G

**KIR:** központi idegrendszer

**L-DOPA:** 3,4-dihidroxi-fenilalanin

**LSD:** lizerginsav-dietilamid

**MAO:** monoamin-oxidáz

**MGC:** metacerebrális óriás neuron (metacerebral giant cell)

**PAP:** peroxidáz-antiperoxidáz

**PB:** foszfát-puffer (phosphate buffer)

**PBS:** foszfát pufferelt fiziológias sóoldat

**PBS-TX:** Triton X-et tartalmazó PBS

**PFA:** paraformaldehid

**PIR:** perifériás idegrendszer

**TRITC:** tetraetil-rodamin izotiocianát

## 1. BEVEZETÉS

A szerotonin (5-HT) az egyik legrégebben felfedezett és kutatott neurotranszmitter. Története a 19. század közepéig nyúlik vissza, amikor a megalvadt vérből kinyert szérumban egy olyan anyagot fedeztek fel a kutatók, mely erőteljes kontrakciót váltott ki a szerveket felépítő simaizomban. Az egyik első kísérlet Ludwig és Schmidt nevéhez fűződik, akik 1869-ben defibrinált vérrel perfundált kutyaizomban vazokonstriktort idéztek elő. A századfordulón megállapítást nyert, hogy a megalvadt vérből kinyert érszűkítő anyag forrása a vérlemezkék. A következő jelentős felfedezés az 1940-es évek végéig váratott magára. Ekkor Irvine Page, Maurice Rapport és Arda Green, a vérlemezkékből sikeresen izolálták, megtisztították és azonosították ezt a hatóanyagot, amelyet 1948-ban szerotoninnak neveztek el a „serum” (savó) latin és a „tonic” (aktiválni) görög szavak összeillesztéséből (Rapport, 1949).

Ugyanebben az időben az előbbi csoporttól függetlenül, olasz kutatók is azonosítottak egy anyagot, amelyet nagy koncentrációban a bélnyálkahártya enterokromaffin sejtjeiben találtak. Ez az anyag szintén összehúzódnak készítette a bél simaizom elemeit. A bél nyálkahártyájából származó vegyületet enteramin-nak nevezték el (Erspamer és Asero, 1952). Az amerikai és az olasz kutatók felfedezése után, Rapport és munkatársai az 5-HT-t és az enteramint megtisztították, kikristályosították és kiderítették, hogy szerkezetileg azonosak, 5-hidroxitriptamin (5-HT) mind a kettő. Évekkel később szintetikusán is előállították az 5-HT-t, melynek biológiai tulajdonsága teljesen megegyezett a természetben előforduló változattal.

Előállítás után nem sokkal, az 5-HT-t jelentős mennyiségben mutatták ki emlősök központi idegrendszerében (KIR) és megállapították, hogy koncentrációja eltérő az agy különböző területein (Twarog és Page, 1953; Amin és mtsai., 1954). Ezekből az eredményekből a kutatók arra a következtetésre jutottak, hogy az 5-HT a KIR egyik neurotranszmittere. Ezt támasztotta alá az a megfigyelés is, hogy az 5-HT *in vitro* a simaizom preparátumon kifejtett hatását antagonizálni lehetett az erősen hallucinogén lizerginsav-dietilamid (LSD) hozzáadásával (Gaddum és Hameed, 1954). Miután az 5-HT-nak számos pszichotikus betegségben (depresszió, skizofrénia, szorongás, agresszió, migrén, étvágytalanság) tulajdonítottak szerepet, kutatása egyre intenzívebbé vált. 1950 és 1970 között az 5-HT élő szervezetben való előfordulását és szerepét vizsgálták. Fluoreszcens hisztokémia vizsgálatok alapján Dahlström és Fuxe (1964) leírták az 5-HT tartalmú neuronok eloszlását patkány agyban. Ezen eredmények alapján elkezdődött az 5-HTerg rendszer neurofiziológiai vizsgálata is. Az 1970-es és 1980-as években a

ligand-receptor kötődés módszerének alkalmazása számos 5-HT receptor típus felfedezését és receptor specifikus gyógyszer kifejlesztését eredményezte.

A gerinceseken folytatott kutatásokkal párhuzamosan gerinctelen fajokon is elemezték az 5-HT előfordulását és élettani szerepét. Welsh és Moorhead 1960-ban kimutatták az 5-HT jelenlétét és mennyiségi eloszlását a gerinctelenek KIR-ben, a gyűrűsférgektől egészen az ízeltlábúakig. Ezek az eredmények közelebb vitték a kutatókat az 5-HT szerepének megismeréséhez. Az 5-HT különböző élettani folyamatokban betöltött szerepét már Page is korán felismerte. Ennek ellenére annak bizonyítása, hogy neurohormonként vagy neurotransmitterként is szerepet tölt be az élő szervezetben, igen lassú folyamat volt. A szakirodalom az 5-HT mint neurotransmitter felfedezését mindenekelőtt Welsh nevéhez köti (lásd: Folk és Mora, 2003), aki ez irányú eredményeit két kagylófajon, a *Venus mercenaria* szívéen és *Mytilus edulis* byssus retractor izomzatán végzett bioassay és papír kromatográfiás vizsgálatok alapján nyerte (Welsh, 1953, 1957). Elméletét, miszerint az 5-HT idegi folyamatok közvetítője bizonyos gerinctelenekben, Erspamer és Ghiretti (1951), Twarog (1954) és Florey (1954) kutatásai is alátámasztották.

Mai tudásunk szerint 5-HT-immunreaktivitást mutató idegsejtek minden állattörzs idegrendszerében előfordulnak (Gardner és Walker, 1982; Parent, 1984; Nässel, 1988; Homberg, 1994; Messenger, 1996). Az állattörzsek legtöbbjében az 5-HT fontos viselkedési és élettani folyamatok szabályozásában vesz részt, beleértve a táplálkozási és szaporodási viselkedést. Hatását kifejezheti, mint neurotransmitter, neuromodulátor vagy mint neurohormon. Számos gerinctelen fajban az 5-HT által szabályozott neuron hálózatokat illetve reflexíveket is részletesen feltárták. Különösen a rovarok, rákok, valamint a csigák és piócák bizonyultak megfelelő modelleknek a viselkedés neuronális alapjainak tanulmányozásához, ezért ezekben az állat csoportokban térképezték fel a legalaposabban az 5-HT tartalmú neuronok eloszlását és kapcsolatait. A kapott eredmények lehetővé teszik a gerincesek és gerinctelenek 5-HT rendszerének összehasonlítását, az anatómiai és viselkedésbeli hasonlóságok vagy különbségek feltárását, továbbá az 5-HT rendszer evolúciójának, illetve evolúciós konzervációjának részletesebb megismerését. Az összehasonlító neurobiológia egyik legfontosabb modell-állatának, a nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*, Pulmonata, Gastropoda) esetében is egyes viselkedési formák 5-HTerg szabályozásával kapcsolatban igen tekintélyes információ áll a rendelkezésünkre. Ezek közül a táplálkozás központi 5-HTerg szabályozásának mechanizmusa részletekbe menően ismert, azonban a kép perifériás szinten távolról sem teljes. Nagyon keveset tudunk a táplálkozás efferens elemeinek, így pl. a pofaizomzat 5-HTerg innervációjáról, és

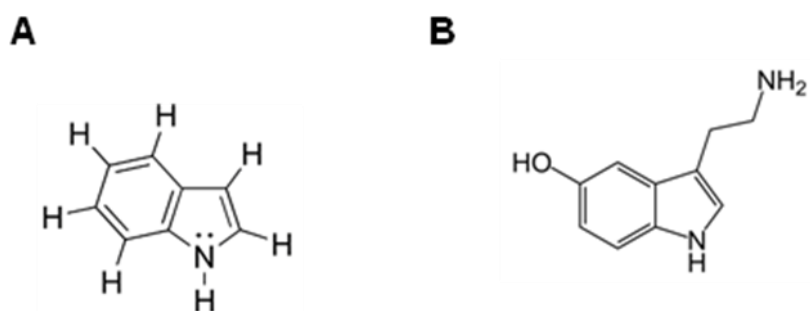
mindenekelőtt annak kialakulásáról az egyedfejlődés során. Ezzel kapcsolatban a gerinces szakirodalomban sem áll mélyreható ismeretanyag a rendelkezésünkre.

Az 5-HT-val kapcsolatos kutatások jelenleg is a neurobiológia egyik központi területét képezik. A különböző molekuláris biológiai módszerek lehetőséget adnak az 5-HT receptorok, az 5-HT metabolizmusában résztvevő enzimek, és az azokat kódoló gének molekuláris szerkezetének megismerésére. Knock-out egerek előállításával és vizsgálatával lehetőség nyílik az 5-HT szerepével kapcsolatos korábbi ismeretek kiteljesítésére, a receptorok funkciójának pontosabb megismerésére, valamint felhívni a figyelmet további, korábban nem ismert 5-HT funkciók jelentőségére is. Mindezek a modern orvostudomány és gyógyszerkutatás fejlődését is elősegítik.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. A szerotonin (5-HT) bioszintézise és biotranszformációja

Az 5-HT az indolaminok csoportjába tartozó vegyület. Molekulaszerkezetének alapstruktúráját egy indol váz adja, ami egy hat szénatomból álló benzol gyűrű és egy ötatomos, nitrogén atomot is tartalmazó pirrol gyűrű összekapcsolódásából áll (1. ábra). Az indol vázzal rendelkező vegyületek közé számos pszichotróp hatóanyag is tartozik, melyek közül a legismertebbek az LSD, a dimetil-triptamin (DMT), a bufotenin (5-OH-DMT) és az 5-metoxi-DMT.



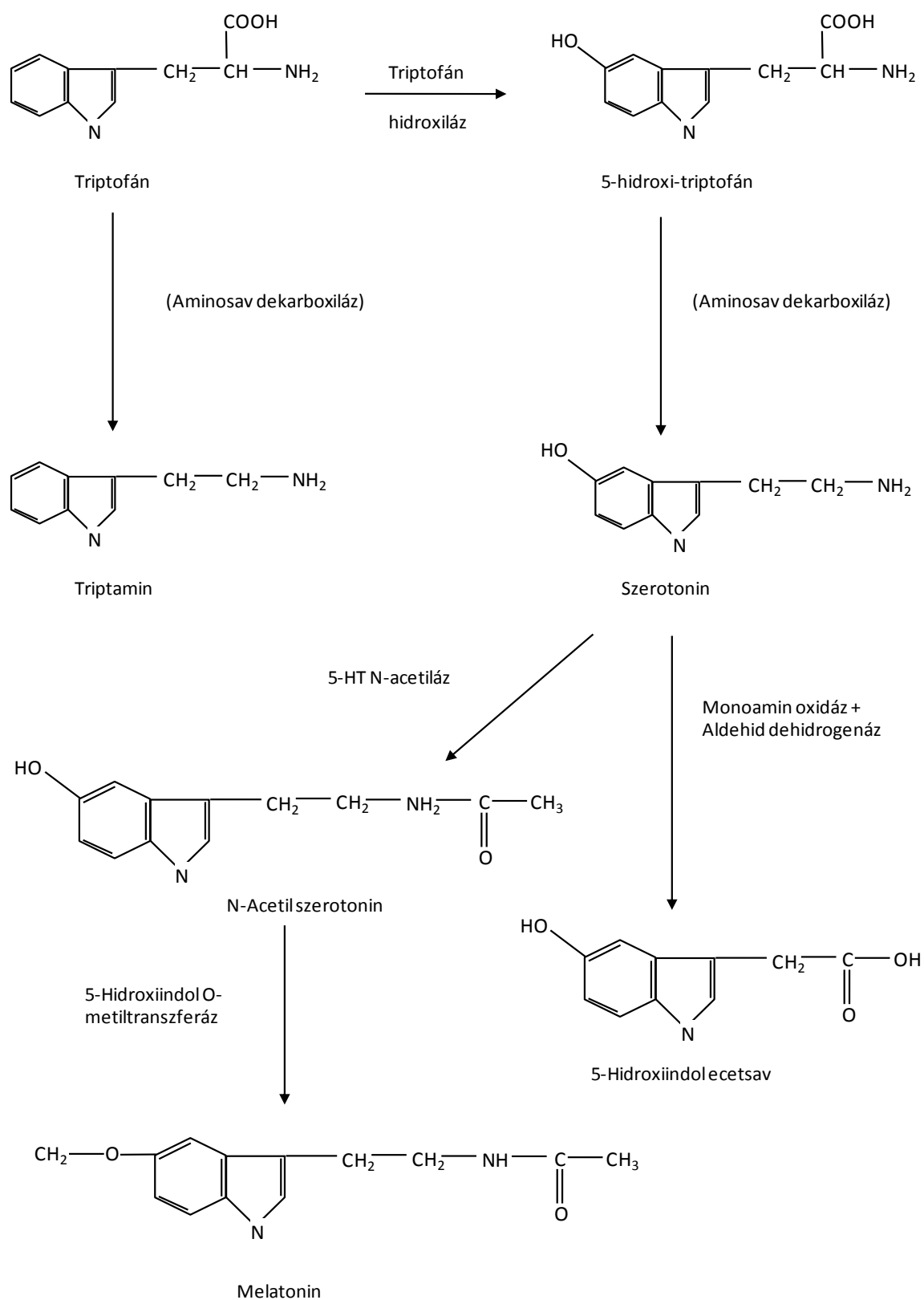
1. ábra: Az indol váz (A) és az 5-HT (B) szerkezeti felépítése.

A gerincesek szervezetében az 5-HT az idegsejteken kívül számos más sejtben, mint például a vérlemezkékben, a hízósejtben vagy az enterokromaffin sejtekben is előfordul. Valójában a szervezetben kimutatható 5-HT-nak csak az 1-2%-a van jelen az agyban. Nem minden 5-HT tartalmú sejt képes azonban szintetizálni az 5-HT-t, azt főleg (90%) a gyomor-bél rendszer állítja elő. A vérlemezkék aktív transzport mechanizmus révén veszik fel a vérplazmából. Mivel az 5-HT molekulában a benzol gyűrűhöz kapcsolt hidroxil csoport és a pirrol gyűrű nitrogénje proton akceptorként szolgál, ezért a molekula hidrofíl tulajdonságú, ami lehetetlenné teszi a lipofilikus vér-agy gáton történő áthatolását. Ezért az agyban található 5-HT-t neuronok szintetizálják, mely folyamat első fontos lépése a triptofán felvétele az idegsejtbe. A triptofán egy elsődleges aminosav, amely az 5-HT szintézis szubsztrátja. A plazma triptofán tartalma elsődlegesen a táplálkozással növelhető. Ha ennek az aminosavnak a szintje nem megfelelő, akkor az agy 5-HT szintje is csökken, az aktív felvétele azonban serkenti az agyba való belépését. A plazma

triptofán szintje nemcsak a bevitt triptofán mennyiségétől függ, hanem a triptofánnal kompetícióban levő nagy neutrális aminosavak koncentrációjától is, melyek a triptofánnal ugyanazon a szállító rendszeren osztoznak. Érthető tehát, hogy a táplálkozással bevitt fehérje és szénhidrát tartalom jelentősen befolyásolja az agy triptofán és a plazma aminosav szintjén keresztül az 5-HT szintjét is. Mivel a plazma triptofán koncentrációja napi ritmusos változást mutat, valószínűnek tűnik, hogy ez a koncentráció változás is jelentősen hat az agy 5-HT bioszintézisére (Bloom és mtsai., 1991).

A felvétel után a következő lépés az 5-HT szintézisében a triptofán 5. pozíciójában lévő szénatom hidroxilációja, melyet követően 5-hidroxitriptofán (5-HTP) keletkezik (2. ábra). Ezt a triptofán hidroxiláz enzim végzi, mely alacsony koncentrációban van jelen mind szolubilis citoplazmatikus, mind partikuláris formában. A triptofán hidroxiláz cDNS klónozása és szekvenálása után összehasonlítva a nyúl triptofán hidroxiláz szekvenciáját a fenilalanin hidroxiláz és tirozin hidroxiláz szekvenciájával, azt az eredményt kapták, hogy mindhárom, pterin-függő aromás aminosav hidroxiláz homológ egymással, utalva ezzel a közös evolúciós eredetre (Bloom és mtsai., 1991). Az 5-HT bioszintézis harmadik lépése - a dekarboxiláció - szinte azonnal bekövetkezik a hidroxiláció után, melyet az 5-hidroxitriptofán dekarboxiláz enzim végez (2. ábra). Ezért az 5-HT szintézis meghatározó szakaszának (rate-limiting step) a triptofán - 5-HTP lépés tekinthető.

A szintézist követően az 5-HT adenosin trifoszfáttal (ATP) alkotott komplex formájában vezikulákban tárolódik az idegvégződésekben, ahonnan mechanikai vagy idegi stimulusra adott válaszként exocitózissal szabadul fel (3. ábra). A depolarizáció kiváltotta 5-HT felszabadulás  $\text{Ca}^{2+}$  függő folyamat. A felszabaduló transzmitter mennyisége függ az idegsejt tüzelési frekvenciájától. A szinaptikus részbe került 5-HT nagy része visszavételre kerül az 5-HTerg végződésekbe egy specifikus, az 5-HTerg neuronokon található transzporter molekula részvételével. A transzporter aktivitása szabályozza az 5-HT koncentrációját a szinaptikus részben, ezáltal hatással van magára a szinaptikus transzmisszióra. Az 5-HT felvétel aktív folyamat, melyhez szükség van sejten kívüli  $\text{Na}^+$  és  $\text{Cl}^-$  ionok jelenlétére. Az 5-HT transzportához egy befelé irányuló  $\text{Na}^+$  gradiens szükséges, melynek fenntartásához energiát kell biztosítani a neuronnak.



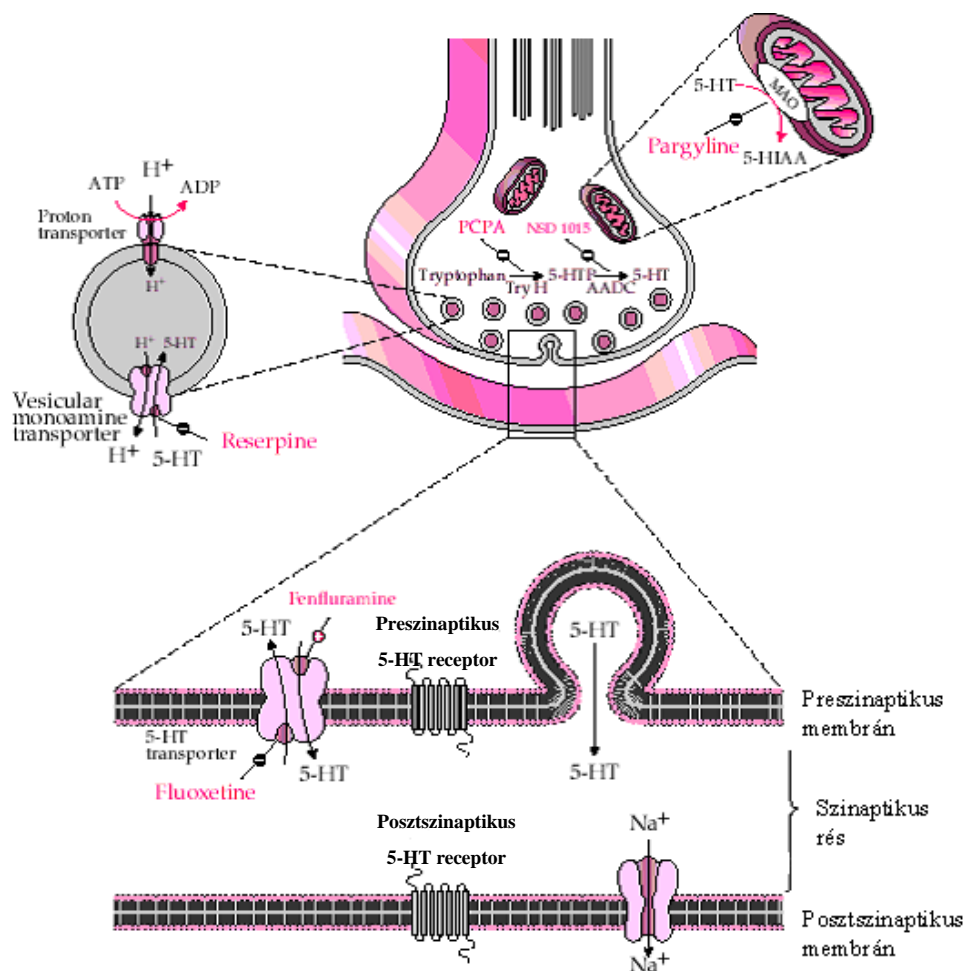
**2. ábra: Az 5-HT szintézise és metabolizmusa.**

A visszavett 5-HT lebontása többlépéses folyamat, amelyért elsősorban a monoamin-oxidáz (MAO) a felelős, mely az 5-HT-t deaminálja, ezáltal 5-hidroxiindol-acetaldehid keletkezik. Ezt a vegyületet az aldehid-dehidrogenáz tovább oxidálja 5-hidroxiindolecetsavvá. Az aldehid köztitermék redukálódhat is a NADH-függő aldehid reduktáz által és 5-hidroxitriptofol keletkezik. A szöveti  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  aránytól függ, hogy oxidáció vagy redukció irányába fog folytatódni a lebomlás. Az 5-HT elsődleges metabolitja az agyban az 5-hidroxiindolecetsav. Olyan enzimeket is azonosítottak a májban és az agyban, melyeknek segítségével nem deamináció történik, hanem 5-szulfátészter keletkezik, mely azután elszállítódik az agyból (Bloom és mtsai., 1991). Mind a gerincesekben, mind gerinctelenekben az 5-HT metabolizmusa az itt leírtakhoz hasonlóan megy végbe, azonban előfordulnak kivételek. A *Gastropodákban*, *Oligochaetákban* és a *Chelicerata* altörzsbe tartozó ízeltlábúakban a MAO viszonylag kis szerepet játszik az 5-HT lebontásában. Ezekben a gerinctelenekben a fő lebontási útvonalat a glutaminsavval történő konjugáció jelenti. A metabolikus termék a  $\gamma$ -glutamil-5-HT (Sloley, 2004).

Az 5-HT nemcsak végterméke egy szintetikus folyamatnak, hanem egy másik fontos biológiai molekula, a melatonin kiindulási anyaga is egyes gerinces agyterületeken (hipotalamusz, tobozmirigy, retina). Az agyban az 5-HT acetiláz katalizálja az 5-HT N-metilációját, amihez a metil-csoportot az S-adenozilmetionin szolgáltatja. A keletkező N-acetil 5-HT-t az 5-hidroxi-indol O-metil transzferáz melatoninná alakítja (2. ábra).

Az 5-HT rendszer működését az agyban részben az 5-HT metabolizmusa kontrollálja. A táplálékkal bevitt többlet triptofán hatására fokozódó 5-HT termelődés és ebből következően megemelkedett 5-HT koncentráció ellenére a kísérleti állatok viselkedésében igen csekély változást lehetett tapasztalni. Azonban ha triptofán mellett még MAO inhibitor is juttattak a szervezetbe, az igen komplex viselkedési tünetcsoportot eredményezett, melyet gyakran neveznek „szerotonin szindrómának” is (Green, 2006).





3. ábra: Az 5-HTerg szinapszis (<http://www.chemistry.emory.edu/justice/seminar/>).

## 2.2. Az 5-HT előfordulása és szerepe a gerincesek idegrendszerében

Gerincesekben az 5-HT az agy egyik „sokfunkciós” neurotranszmittere, amely számos élettani, endokrin és viselkedési folyamatot szabályoz. Egészséges működése sok helyen sérülhet (szintézis, felszabadulás, szállítás, kötődés, lebontás), ami az élet során fellépő „amortizációval” (betegség, öregedés), külső mérgező behatással (kábitószer) is összefüggésbe hozható, de azt genetikai hiba is okozhatja. Az 5-HT rendszer megváltozása hangulatzavarokat is eredményezhet, amelyek közül a legismertebb a depresszió. Depresszióban és szorongásos zavar esetében nagyszámú közvetlen és közvetett biokémiai vizsgálat igazolja az agy 5-HT-anyagcseréjének jól mérhető változásait (Barnes és Sharp, 1999; Hoyer és mtsai., 2002). Az

eltérések hatására a rendelkezésre álló 5-HT mennyiség kisebb a szükségesnél, ezért az 5-HTerg idegpályák működése megváltozik.

Az 5-HT tartalom az idegrendszerben specifikus neuronális elemekhez köthető. Az először fluoreszcens hisztokémiai (Falk és mtsai., 1961; Dahlström és Fuxe 1964; Falk és Owman, 1965) majd később immunhisztokémiai (Green és Curzon, 1968) módszerrel megjelenített 5-HT tartalmú sejtcsoportok az agytörzsi híd raphe régióiban lokalizálódnak. A raphe rendszer az agytörzs keresztmetszetében végighúzódó és pályakereszteződésekből formálódó „vonal”. Egyes területein az 5-HTerg neuronok nagyobb megjelenési gyakoriságot mutatnak. Ezek a területek alkotják a raphe magokat. A gerincesek raphe magokba tömörült 5-HTerg neuron populációja anatómiailag egységesnek tűnik, azonban a különböző raphe magok a KIR eltérő területeit innerválják; továbbá maguk a raphe magok is különböző egységekbe (doménekbe) különülnek el az idegi kimeneteik és célspecifitásuk alapján (Peyron és mtsai., 1997). A magokat superior és inferior csoportokra lehet felosztani. A csoportosítás a mesencephalikus és myelencephalikus csoportok korai fejlődési megjelenésén alapszik (Jacobs és Azmitia, 2002). A superior csoportba négy fő magcsoport, míg az inferiorba öt fő magcsoport tartozik. A monoaminerg rendszeren belül ez az 5-HTerg rendszer tartalmazza a legtöbb neuront (Parent, 1984), de az agy összsejtszámahoz viszonyítva ez természetesen elenyészően alacsony sejtszámot képvisel. E sejtek nyúlványrendszerei azonban rendkívül kiterjedt kapcsolatokkal rendelkeznek, amelynek feltérképezését retrográd és anterográd axon transzport vizsgálatok tették lehetővé. A raphe magokból kiinduló 5-HTerg leszálló rostok a gerincvelőbe vetülnek, ahol szenzoros és motoros neuronokkal egyaránt kapcsolatba lépnek, utóbbiak ingerlékenységét fokozzák (Prasada és mtsai., 1987). A felszálló rostok a neocortexbe és a hippocampusba, a striatumba, a limbikus rendszerbe és a szaglópályákhoz futnak (Fritsch és mtsai., 1984). A rostok a posztzinaptikus neuronon kifejeződő 5-HT receptor típusától függően vagy serkentő hatásúak (pl. neocortikális piramissejtek), vagy gátlók (hippocampus). Az 5-HTerg végződések rendszerint specializált szinaptikus kapcsolatot alkotnak a cél idegsejttel, azonban az emlős KIR néhány területén az 5-HT rendszerre jellemzőek az olyan varikozitások nagy száma, melyeknek 80%-a nem szinaptikus jellegű (Parent, 1984). Ezekben a kapcsolatokban a felszabadult neurotranszmitter az intracelluláris térben néhány 100 mikron távolságban szétdiffundál, mely egy dinamikus, de kevésbé specifikus hatást jelez a viszonylag stabil és erős szinaptikus kapcsolatokkal szemben. A nem szinaptikus 5-HT felszabadulás szemléletes példája található a primitív gerincesek (folyami ingola) gerincvelőjében, ahol a motoros és premotoros neuronok közelében 5-HTerg varikozitások fordulnak elő, de szinaptikus

kapcsolatokat nem hoznak létre (Wallen és mtsai., 1989). Itt az ingerületátvitel modulátoros formája jelenik meg, mely lassú, általános hatású, és ezért az idegi információ átadás egyszerűbb formáját képviseli.

A gerincesekben tehát az 5-HT az agytörzs raphe-magjaihoz kötődik, ahonnan nyúlványok hálózatán keresztül számos előagyi területhez és a gerincvelő bizonyos részeihez is eljut. Az 5-HT szinte minden elképzelhető élettani funkció és viselkedés szabályozásában részt vesz: a hangulat, a szorongás (Abrams és mtsai., 2005), az agresszivitás (Virkkunen és mtsai., 1995), az alvás- ébrenlét-ciklus (Horner és mtsai., 1997), a fájdalomérzet (Li és mtsai., 1997), az étvágy (Pinchasov és mtsai., 1989), a szexuális aktivitás (Naumenko és Popova, 1975) és a helyváltoztatás (Cazalets és mtsai., 1992) a legismertebbek. Az 5-HTerg rendszer ilyen széleskörű funkciót nem tudna ellátni, ha nem rendelkezne kiterjedt nyúlványrendszerrel és molekuláris szinten különböző és eltérő eloszlású receptorokkal. Az azonosított 5-HT receptorok száma szinte napról napra növekszik. Az 5-HTerg receptorok mind a KIR-ben, mind a szervezet más területein (bélfal, vérlemezkék) is jelen vannak (Peroutka, 1994). Noha az 5-HT a gerincesek számos fiziológiai és viselkedésszerű folyamataiban részt vesz, úgy tűnik nem nélkülözhetetlen egyikhez sem. Az elektrofiziológiai vizsgálatok kimutatták, hogy a raphe magokban lévő 5-HTerg neuronokra egy lassú, tónusos tüzelési mintázat jellemző, melyet eltérő élettani körülmények között is megőriznek (Aghajanian és Sanders-Bush, 2002). Ez feltételezi egy belső, tónusos pacemaker mechanizmus létét, melyből következik, hogy az 5-HT rendszer fontos homeosztatisztikus funkciót lát el. Az agy és a gerincvelő különböző régióiban az idegi ingerlésre kifejtett hatása alapján az 5-HT rendszer stratégiaiilag fontos pozíciót tölt be az agyban, ami lehetővé teszi számára a komplex szenzoros és motoros mintázatok összehangolását különböző viselkedési állapotokban. Az 5-HTerg neuronok aktivitása az ébredési periódusban a legmagasabb, a lassú hullámú alvás fázisban lecsökken és megszűnik a REM fázis alatt. Feltételezhetően az 5-HT rendszer funkciója az aktivitásában jelentkező összehangolt fluktuációval előmozdítani az adott viselkedési állapotot.

Élettani kutatások továbbá feltárták, hogy az agyi 5-HTerg rendszer nem egységes, hanem - nagyon leegyszerűsítve - legalább két funkcionális alegységből áll (Steinbusch és Mulder, 1984). Az egyik, a mediális raphe-rendszer a külső változásokhoz (elsősorban a kedvezőtlen irányú változásokhoz, a veszteségekhez) való alkalmazkodást, a toleranciát szolgálja; ennek károsodása fokozza a stresszhatásokat, megnehezíti azok elviselését, ami a depressziós állapot jellegzetes sajátossága. A másik a dorzális raphe-rendszer viszont inkább egy „veszély-figyelő” berendezés: váratlan és potenciálisan veszélyes külső ingerek hatására leállítja, megbénítja az aktív

cselekvést (és ennek szubjektív velejárója a szorongás érzése). Ha ebben a rendszerben támad zavar, akkor már enyhe, hétköznapi és ártalmatlan ingerek is „vészreakciót” válthatnak ki.

Számos bizonyíték szól amellett, hogy az étvágytalansággal (anorexia nervosa) vagy az elhízás (obesitas) egyes típusaival küzdő betegeknél a központi 5-HT metabolizmus eltér a normálistól.

Az intenzív kutatások ellenére a központi 5-HTerg szabályozás pontos szerepe a táplálkozásban még vitatott. Feltételezhetően az 5-HT hatással van a táplálék minőségi összetételének érzékelésében, illetve kihat a bélaktivitásra, csökkentve a táplálkozást. A legszéleskörűbb szemlélet szerint a megemelkedett 5-HT aktivitás hosszabb ideig fenntartja a telítettség érzetet, elnyújtva ezzel a jóllakottság állapotát (Simonszky, 1996). Mindazonáltal az 5-HT rendszer nem alapvető strukturális eleme a specifikus táplálkozási vagy endokrin eseményeknek, de modulálja azok megjelenését. A legújabb kutatások szerint a dorzális és mediális raphe magok 5-HTerg neuronjainak aktivitása drámaian megemelkedik a szájüreg ritmikus, motoros aktivitása, a rágás, harapás következtében. A két raphe mag 5-HTerg neuronjai a táplálkozási viselkedés során nem egyidejűleg aktiválódnak, néhányuk a viselkedést megelőzően kerül fokozottabb ingerületi állapotba (táplálék látványára vagy illatára), míg más neuronok aktivitása együtt emelkedik a ritmikus rágómozgások aktivitásával. A legtöbb azonban tónusos aktivitást mutat a táplálkozási viselkedés alatt. Végül ezek közül a neuronok közül számos a fej és nyak területéről bejövő szomatoszenzoros ingerek hatására aktiválódik (Jacobs és Azmitia, 2002). A dorzális raphe magok egyes 5-HTerg neuronjaihoz az orexin tartalmú neuronok nyúlványokat küldenek, rajtuk keresztül hatva a kéregben és az amygdalában kialakuló izgalmi állapotra (arousal). A dorzális raphe magok 5-HTerg neuronjai negatív visszacsatolás útján egy időben gátló hatást fejtenek ki az őket beidegző orexin tartalmú neuronokra, ezáltal az 5-HT rendszer igen finoman képes hangolni az emlősök étvágyát és táplálkozási aktivitását (Bray és Bouchard, 2008).

A központi idegrendszeren belül az 5-HT jelen van egy nagyon kicsi, nem neuronális szervben (1 mg súlyú rágsálókban) is, a talamusz dorzális felszínének kötőszövetében elhelyezkedő tobozmirigyben (Aghajanian és mtsai., 1987). Sejtjei a melanophorák összehúzóását kiváltó hormont, a melanotonint termelik.

A periférián az 5-HT a motilitás szabályozásában játszik fontos szerepet. Az emberi szervezetben az 5-HT 90%-a az emésztőrendszer nyálkahártyájában elhelyezkedő enterokromaffin sejtekben található. A bél idegrendszer 5-HTerg neuronjai együttműködve más neuromodulátorokkal egy komplex hálózat tagjaként működnek, amely hálózat összeköti a

gasztrointesztinális traktus pillanatnyi állapotáról számot adó szenzoros jeleket az izom, a szekretoros és felszívó hám, valamint az enteroendokrin sejtek effektor működésével. Következésképpen az 5-HT számos viscerális funkció szabályozásában részt vesz (Blundell, 1979).

### **2.3. Az 5-HT előfordulása és szerepe a gerinctelenek idegrendszerében**

Gerinctelenekben az 5-HT celluláris lokalizációja sokkal szétszórtabb, mint a gerincesekben, ezért a gerinctelenekben betöltött élettani, fiziológiai szerepének meghatározása is sokkal nehezebb, nem annyira „uniformizálható”, mint a gerincesekben. Az emlősökben az 5-HT tartalmú idegsejtek egyetlen régióban, az agytörzsi raphe magokban koncentrálnak, míg a gyűrűsférgekben (Lent és mtsai., 1991), ízeltlábúakban (Beltz és Kravitz, 1983; Nässel, 1988; Homberg 1994) és puhatestűekben (McCaman és mtsai., 1984; Kemenes és mtsai., 1989; Hernádi és mtsai., 1989) az idegrendszerben szétszórtan, különböző ganglionokban fordulnak elő. A központi neuronhálózatok 5-HTerg elemei kapcsolatrendszerükön keresztül egy tagolt rendszert, vagy más néven tagolt arousal hálózatot (distributed arousal network) alakítanak ki, mely a szervezet pillanatnyi állapotáért felelős (Jing és Gillette, 2000; Gillette és Jing, 2001; Jing és Gillette, 2003).

A gyűrűsférgek (Annelida) idegrendszere viszonylag egyszerű felépítésű, kevés idegsejtből áll. A legtöbb idegsejt a garat körüli központi gangliongyűrűben található. A többi idegsejt a hasdúclánc ganglionjaiban helyezkedik el. A gyűrűsférgek háti (dorzális) és hasi (ventrális) oldalán hosszanti lefutású idegpályák, valamint subventrális és subdorzális elhelyezkedéssel vékonyabb idegtörzsek futnak. A feji rostrális, anterior rész szegmentális ganglionjaiban mérhető a legmagasabb 5-HT koncentráció, ennél kisebb koncentrációban fordul elő a cerebrális ganglionban és mennyisége a farki régió felé haladva folyamatosan csökken a szegmentális idegdúcokban (Lent és mtsai., 1991; Gardner és Walker, 1982). Piócákban biokémiai és immuncitokémiai vizsgálatokkal kimutatták, hogy az 5-HT elsősorban a hasdúclánc egyes ganglionjaiban párosan elhelyezkedő Retzius-sejtekben, továbbá kisebb szimmetrikus sejtcsoportokban van jelen. A ganglionokban azonosított 5-HT tartalmú neuronok közül egy-egy effektor (Retzius) sejt, négy pedig interneuron (Lent és mtsai., 1991). A páros óriás (100-120 µm) Retzius-sejtek mérete a test hossza mentén változik és az egyetlen olyan 5-HTerg neuron típus a piócában, mely a periférián végződő axon kimenettel rendelkezik, aktivitásakor

fokozódik az izmok relaxációja. Anatómiai, elektrofiziológiai és farmakológiai vizsgálatok alapján megállapították, hogy éhes piócában az 5-HTerg rendszer kiváltja a táplálékkereső viselkedést (intenzívebb úszás), és beindítja az emésztést (Lent és mtsai., 1991; Kristan és mtsai., 2005). Az 5-HT koncentráció az állat éhség-jóllakottság állapotával jól korrelál. Éhes piócában magas 5-HT szint mérhető, mely stimulus hatására kiváltja az úszó mozgást, egyben serkenti a garat összehúzódást, a szívó mozgást és a nyáleválasztást. A Retzius-sejtek axon varikozitásaiból felszabaduló 5-HT aktiválja a nyálmirigy sejtjeit, de az sem kizárt, hogy a véráramba került 5-HT hormonálisan serkenti azokat (Marshall és Lent, 1988). Az 5-HT fontos, összetett szerepet tölt be az úszás szabályozásában is. A pióca egyes 5-HT tartalmú interneuronjai szinaptikus kapcsolatok színjén modulátorként vesznek részt az úszás gyors kiváltásában, míg a Retzius-sejtekből felszabaduló 5-HT neurohormonként stimulálja az úszó mozgást (Kristan és mtsai., 2005). Willard (1981) kísérleteiben bebizonyította, hogy a pióca megemelt 5-HT szintje serkenti az úszásért felelős motoros programot, megemeli az úszás valószínűségét anélkül, hogy hatna a motoros program aktuális teljesítményére. A pióca vérének 5-HT-jének napi fluktuációja az 5-HT-nak a cirkadián ritmus szabályozásában betöltött szerepére utal (Itoh és Igarashi, 1996). Az 5-HT egyes tanulási folyamatok, mint a szenzitizáció és habituáció kialakításában is részt vesz (Burrell és mtsai., 2001; Burrell és Sahley, 2005). A különböző gyűrűsféreg fajokban az 5-HT nem egyformán hat az ideg-izom kapcsolatokban. Például a soksertéjű gyűrűsférgekben relaxálja a hosszanti dorzális izmot, de az acetilkolin (ACh) által kiváltott kontrakciót nem gátolja (Alvarez és mtsai., 1969). A *Lumbricus terrestris*-ben kimutatták, hogy az 5-HT összehúzza az izolált testfalat, de gátolja a vizscerális izomzatot (Andersson és Fänge 1967; Gardner és Walker, 1982). 5-HT-IR érzősejtek jelenlétét a *Lumbricus* és *Eisenia* testfalában írták le (Csoknya és mtsai., 2005).

Az ízeltlábúak (rovar) központi idegrendszerére is jellemző a központosult idegrendszer. A fej első három szelvényének ganglionjai összeolvadva alkotják az úgynevezett agyat, az ezután következő három ganglionpár a garatalatti dűcot. Biokémiai és farmakológiai vizsgálatok igazolták, hogy az 5-HT a rovarok agyában nagy koncentrációban van jelen, mely viszonylag kevés neuronban lokalizálódik (Hiripi és S-Rózsa, 1987; Nässel, 1988; Homberg, 1994). Az agyban és a garatalatti dűcban 64 5-HT-IR idegsejt van a légyben, 100 a csótányban és 75 a méhekben. A látólebenyben, mely ugyancsak három ganglion (a lamina, a medulla és a lobula) fúziója, az 5-HTerg idegsejtek a lamina és medulla egész területén előfordulnak (Nässel és Klemm, 1983), míg 5-HTerg rostokat mindhárom ganglion neuropilje tartalmaz. A lobulában jelenlévők létesítenek kapcsolatot a laterális protocerebrummal. Az 5-HT szabályozza a látó

rendszer működését (Nässel, 1988; Kloppenburg és Erber, 1995). A *Manduca sexta* antennális lebenyében az 5-HT-IR neuronok sejttestjei bilaterálisan elágaznak, egyrészt a felső protocerebrumba vetülnek, másrészt axonjaik a kontralaterális antennális lebenybe futnak és ott a lebeny összes glomerulusába végződéseket küldenek (Kent és mtsai., 1987). Nagyon hasonló 5-HTerg neuronokat találtak *Periplaneta americana*-ban, azzal a különbséggel, hogy ezek az 5-HT-IR neuronok ipszilaterálisan ágaztak el (Salecker és Distler, 1990). Annak ellenére, hogy az ízeltlábúak KIR-e kevés 5-HT-IR idegsejtet tartalmaz, azok arborizáció illetve nyúlványrendszere rendkívül kiterjedt (Nässel 1988; Homberg 1994). A másik fontos tulajdonsága az ízeltlábúak KIR-ében jelenlevő 5-HT-IR neuronoknak, hogy azok csoportokba tömörülve helyezkednek el az agy egyes területein vagy a szegmentális ganglionokban. Az 5-HT-IR idegsejtek száma az egyes szegmensekben különbözik. A rovarok KIR-ében a legtöbb 5-HT-IR sejt interneuron, melyek jelentős része interszegmentális interneuron.

Az 5-HT szerepet játszik a rovarok perifériás idegrendszerében is, pl. a sztomatogasztrikus rendszerben vagy a neurohemális szervben, a corpus cardiacumban (Klemm és mtsai., 1986; Nässel, 1988), de innerválja pl. a nyálmirigyet (Baines és mtsai., 1989), a genitális szervek izomrendszerét (Elekes és Hustert, 1988) és a Malpighi edények működését, a kiválasztást is (Maddrell és Phillis, 1975). Egyes rovar fajokban pl. a tücsökben az 5-HT szabályozza a cirkadián ritmust (Cuttle és mtsai., 1995). Egyes rovarok érző neuronjai is tartalmaznak 5-HT-t. Így például a sáska lábában elhelyezkedő 5-HTerg szenzoros neuronok két csoportját különítették el, melyek közül az egyik a külső mechanoreceptorokkal, míg a másik a belső proprioreceptorokkal kapcsolt (Lutz és Tyrer, 1988).

*Drosophila* esetében az 5-HT<sub>1BDro</sub> receptorok jelenléte a rovar agy azon területein, ami a tanuláshoz és a memóriához köthetőek, felveti az 5-HTerg rendszer szerepét a tanulási folyamatok kialakulásában (Yuan és mtsai., 2005).

A rákok KIR-ében több mint 100 5-HT-IR neuron található, elsősorban az agyban, de jelen vannak az ötödik torakális ganglionban és az abdominális ganglionokban is (Beltz és Kravitz, 1983). 5-HT immunreaktivitást a sejttestek, a központi neuropil régió és a neurohormonális régiók is mutattak, ellentétben a sztomatogasztrikus, eosephagalis és kardiális ganglionnal. Rákokban az 5-HTerg rendszer szerepet játszik az izmok kontrakciójának szabályozásában (Florey és Rathmayer, 1978). Az exoszeletális izmok kontrakcióját az 5-HT úgy váltja ki, hogy az ideg-izom kapcsolatokban megnöveli a serkentő junctionális szinaptikus potenciálokat, megemelve így az adott idegvégződésből felszabaduló neurotranszmitter mennyiséget, valamint hatására gyorsan lefutó impulzusok (spike) keletkeznek az izomrostokban

és az izmok beidegzéseiben (Glusman és Kravitz, 1982). Az 5-HTerg rendszer továbbá felelős egy motoros program beindításáért, mely a rák testtartásának kialakításában résztvevő vázizmokat stimuláló és gátló effektor idegsejtek koordinált tüzelési mintázatából áll (Glusman és Kravitz, 1982). A folyamat hatására a rák egy jellegzetes támadó vagy dominanciát kifejező pózba merevedik. Az 5-HT nem csak a serkentő, hanem a gátló idegi stimuláció hatékonyságát is emeli. Mivel számos az 5-HT-ra érzékeny periférikus szövetben nem tudtak 5-HT tartalmat mérni, nagy valószínűséggel ezekben a szövetekben neurohormonként hathat. Ezt támasztja alá a hemolimfában mérhető 5-HT koncentráció. Az 5-HT a második torakális ideggyök felszíne mentén található varikózus rostok gazdag hálózatából juthat a hemolimfába (Beltz és Kravitz, 1983). Az 5-HTerg rendszer szintén hormonális úton szabályozza a rák szívműködését, emelvén a szívverés frekvenciáját és erősségét (Cook, 1966).

A fentiek alapján jól látható, hogy az 5-HT-nak sokoldalú multifunkciós szerepe van a gyűrűsférgek és ízeltlábúak különböző magatartási és fiziológiai folyamataiban. Az 5-HTerg neuronok között találhatunk érző, inter- és efferens (mozgató) neuronokat is, ami arra utal, hogy az 5-HT szenzoros, interneuronos és motoros neurotranszmitter vagy modulátor is lehet. A központi idegrendszerből kilépő és a periférikus szöveteket behálózó 5-HT-IR idegnyúlványokon keresztül az 5-HTerg rendszer képes közvetlenül is szabályozni egyes élettani folyamatokat és viselkedési formákat. Az 5-HT a hemolimfába kerülve neurohormonként is kifejtheti hatását.

## **2.4. Az 5-HT előfordulása és szerepe a puhatestűek idegrendszerében**

Vizsgálataink modell állata a nagy mocsári csiga, *Lymnaea stagnalis* volt, ezért külön fejezetben szeretnék általános bepillantást nyújtani a puhatestűek idegrendszerének 5-HTerg rendszerébe, különös tekintettel a *Lymnaea* KIR-ében elhelyezkedő 5-HTerg neuronokra és morfológiai funkcionális jellemzőire.

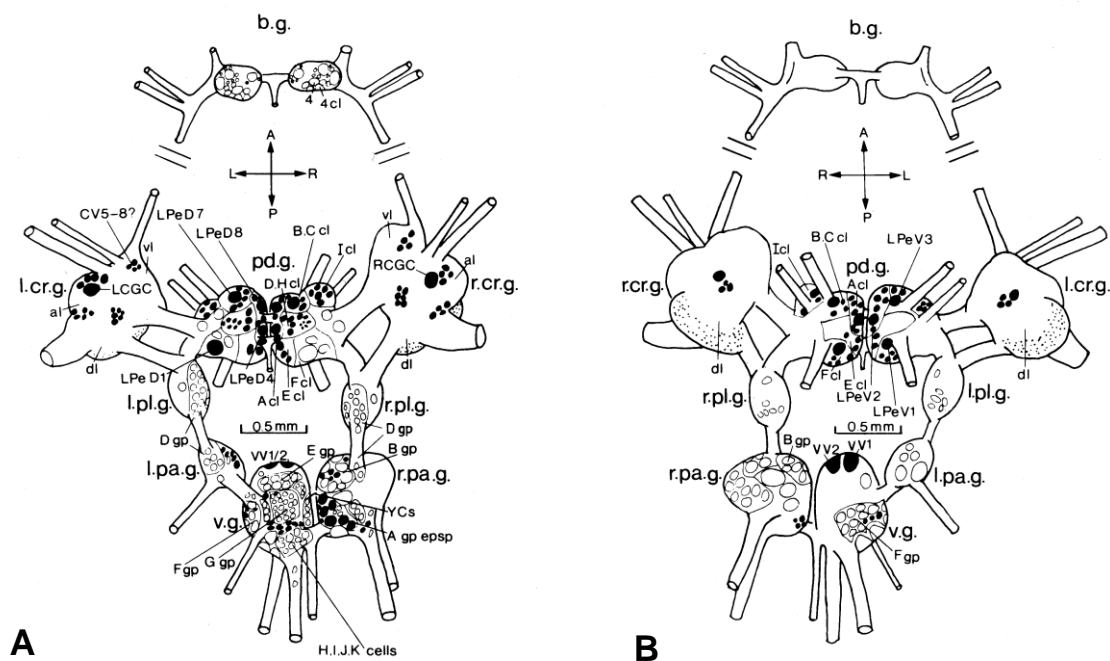
5-HT illetve az 5-HT tartalmú neuronok jelenlétét, eloszlását és szerepét a puhatestűek mindhárom osztályában leírták az elmúlt évtizedek során (Gerschenfeld, 1973; Hiripi és mtsai, 1973; Walker és mtsai., 1986; Messenger, 1996). Hasonlóan az ízeltlábúakhoz és a gyűrűsférgekhez az 5-HT tartalmú neuronok a puhatestűek központi idegrendszerében is szétszórtan, különböző ganglionokban csoportokat alkotva fordulnak elő (Matsutani és Nomura, 1986; Uemura és mtsai., 1987, Hernádi és mtsai, 1989; Kemenes és mtsai, 1989; Sudlow és



mtsai, 1998). A puhatestűek központi idegrendszere viszonylag nagy mennyiségű 5-HT-t tartalmaz. A kagylók osztályába tartozó *Pecten mugellunicus* viszcserális ganglionjában 36 µg/g 5-HT-t mértek. Egyes kagylók KIR-e akár ennél is több 5-HT-t tartalmaz. Például egy *Venus* fajban a ganglionok 5-HT tartalma magasabb, mint 40 µg/g, *Anodonta cygnea*-ban pedig 32-43 µg/g között mozog a szezonális körülményektől függően (valamennyi érték nedves tömegre vonatkoztatva, Welsh és Moorhead, 1960). Érdekes, hogy a fejlábúak osztályában a rendkívül fejlett KIR-ben az 5-HT koncentrációja viszonylag alacsony. Az *Octopus vulgaris* ganglionjaiban pl. csak 0.7 és 3.2 µg/g között mérték az 5-HT koncentrációját (Welsh és Moorhead, 1960). Kerkut és Cottrell (1963) a csigák osztályába tartozó *Helix aspersa* agyában 4 µg/g (nedves tömeg) 5-HT-t, míg a köpenyben és a szívben 1, ill. 3 µg/g-ot határozott meg. *Lymnaea* ganglionjaiban a teljes 5-HT koncentráció 848 pmol volt, melyből a pedális (463 pmol), a cerebrális (163 pmol) ganglion és a viszcero-parietális komplex (119.6 pmol) 5-HT-t tartalmazott. Az 5-HT koncentráció a bukkális ganglionban (51.6 pmol) volt a legalacsonyabb (Kemenes és mtsai, 1989). Szintén nem egységes az 5-HT eloszlása az *Aplysia californica*-ban és egy másik Opisthobranchia fajban, a *Tritonia diomedea* KIR-ében sem (McCaman és mtsai., 1984; Ono és McCaman, 1984; Fickbohm és mtsai; 2001), ezekben a fajokban a legnagyobb koncentrációban az 5-HT-t a pedális ganglionban, majd csökkenő sorrendben a cerebrális, az abdominális, a pofa és a pleurális ganglionban találták.

A puhatestűek törzsén belül a csigákban vizsgálták a legrészletesebben az 5-HT tartalmú idegsejt eloszlását, nyúlványrendszereiket és azok kapcsolatait. A csigák KIR-ében az 5-HT-IR neuronok döntően a cerebrális és a pedális ganglionokban helyezkednek el (Kemenes és mtsai., 1989; Hernádi és mtsai, 1989; Satterlie és mtsai., 1995; Sudlow és mtsai 1989; Jing és Gillette, 1999; Hochberg, 2007), míg a bukkális és pleurális ganglionokban nincsenek jelen, csak nyúlványrendszereik. Az 5-HT-IR neuronok eloszlását a *Lymnaea stagnalis* KIR-ében immunhisztokémiai, fluoreszcens hisztokémiai és hamis transzmitter 5,6-dihidoxitriptamin kiváltotta pigment jelölés módszerével tanulmányozták (4. ábra, Kemenes és mtsai., 1989). A pofaganglionban és a pleurális ganglionban nem találtak 5-HT tartalmú neuronokat, ezzel szemben a cerebrális ganglionban az összes 5-HT-IR neuron 21,6%-a, a pedális ganglionban 58%-a volt megtalálható. A ganglionokban vizsgált 5-HT-IR tartalmú neuronok száma és eloszlása, valamint a biokémiai módszerrel (HPLC) mért 5-HT tartalom szoros korrelációt mutatott. A csigák legjobban ismert 5-HT tartalmú neuronja a cerebrális ganglionban elhelyezkedő páros óriás idegsejt (CGC) (McCaman és mtsai., 1984). Ennek az óriás 5-HTerg sejtpárnak a homológ megfelelői számos csiga fajban megtalálhatóak (*Lymnaea*-ban – CGC,

*Aplysia*-ban - MCC, *Helix*-ben – MGC, *Aplysia Tritonia*-ban C1 neuron), melyből axonok futnak a cerebro-bukkális konnektívumba, és beidegzik a bukkális gangliont, valamint a pofaizomzat egyes részeit és a nyálmirigyet (Granzow és Rowell, 1981; Pentreath és mtsai, 1982; Croll, 1987; Kemenes és mtsai., 1989; Satterlie és mtsai., 1995). Ilyen egyedülálló 5-HTerg neuron a ganglionokban csak ritkán fordul elő. Általában az 5-HT tartalmú sejtek csoportokban, clusterekben helyezkednek el. Ilyen kisebb méretű (15-40  $\mu$ m) sejtekből álló csoport helyezkedik el a cerebrális ganglion ventrális lebenyében, a cerebro-bukkális konnektívum eredésénél. Úgy tűnik, hogy ezek a neuronok megfelelnek a cerebrális táplálkozási rendszer neuronjainak (CV5-cerebral ventral 5, CV6, CV7, CV8, melyek közül pl. a CV7 az ajak motoros neuronjai; McRohan és Benjamin, 1980b). A pedális ganglionban található az összes 5-HT-IR neuron 54,8%-a. A bal és a jobb pedális ganglionban is egyaránt találtak óriás neuronokat, mind a dorzális (PeD4, PeD7, PeD8), mind a ventrális (PeV1, PeV3) felszínen. A bal parietális ganglion ventromediális felszínén négy-hat közepes és nagyobb méretű sejtet és néhány óriás neuront (LP1, LP2, LP3) lehet azonosítani. A viscero-parietális komplex az összes 5-HT tartalmú neuron 21,6%-át tartalmazza. Valamennyi ganglion neuropil régióját gazdagon behálózzák az 5-HT-IR axonok. Finom 5-HT-IR varikózus rostok mutathatók ki a ganglionokat körülvevő kötőszöveti burokokban is.



**4. ábra: Az 5-HT-IR neuronok eloszlása a *Lymnaea* KIR-ben. Ventrális (A) és dorzális (B) nézet (Kemenes és mtsai., 1989).**

Egy másik, a tüdőcsigák rendjébe tartozó puhatestű, a *Helix pomatia* KIR-ében az 5-HT-IR neuronok eloszlása hasonló képet mutat, mint *Lymnaea*-ban. 5-HT-IR neuronok minden ganglionban előfordulnak, kivéve a pofa és pleurális ganglionokat (Hernádi és mtsai, 1989).

A *Helix* egyes 5-HTerg csoportjait alkotó neuronok száma évszakos változást mutat (Hernádi és mtsai, 1989); a téli időszakban a tavaszi időszakhoz képest jelentősen kisebb a számuk. A *Helix* ganglionjait burkoló kötőszövetes részben egy sokkal fejlettebb az 5-HT-IR rendszer található, mint a *Lymnaea* idegrendszerében, mely a vastagabb kötőszöveti burok következménye lehet. Ebben az extrém módon fejlett kötőszövetes burokban jelen levő 5-HT-IR hálózat az 5-HT neurohormonális szabályozó szerepére utal egyes perifériás folyamatokban, melynek során az 5-HT felszabadulása után a hemolimfába kerülve éri el az egyes szerveket (Hernádi és mtsai., 1989; Hernádi 1992). Elektronmikroszkópos vizsgálatokból (Elekes, 1991) kiderült, hogy a *Helix* ganglionok kötőszövetében az 5-HT-IR végződések részben vagy egészben mentesek glia nyúlványoktól, szabadon végződnek, megerősítve azt a feltételezést, hogy ezek az elemek 5-HT-t szabadítanak fel a hemolimfába. A hemocitákból is juthat 5-HT a hemolimfába, mivel ezek a sejtek is képesek a szintézisére (Stefano és mtsai., 1989).

Hasonlóan az emlősök és az ízeltlábúak 5-HTerg rendszeréhez a csigák KIR-én kívül 5-HT-IR idegrostok gazdagon innerválnak perifériás szöveteket is, pl. a tapogatókat, a talp hámrétegét, a szaporodási szerveket, és a teljes pofarégiót, továbbá a nyelőcsövet és a nyálmirigyet (Moroz és mtsai., 1997; Hernádi és mtsai, 1998; Hochberg, 2007 Kiss és mtsai., 2010).

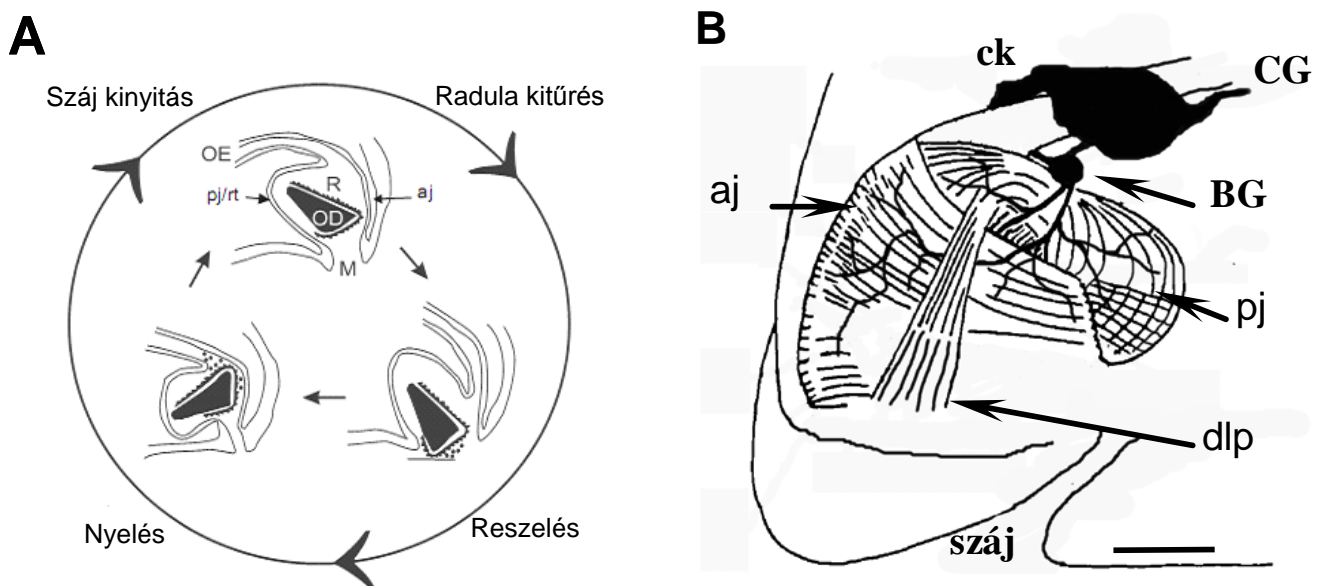
Az 5-HT a puhatestűek idegrendszerében az egyik legfontosabb neurotranszmitter, szerepe központi és periférikus folyamatok szabályozásában egyaránt jelentős (Gerschenfeld, 1973; Walker és mtsai., 1986). A csigák ganglionjaiban található 5-HTerg sejtek különböző érző és motoros neuronhálózatok intrinsic (belső) elemei, melyekben neuromodulátor szerepet töltenek be (Gillette és Davis, 1977; Kupfermann és Weiss, 1981; Walters, 1991; McPherson és Blankenship, 1991; Katz és mtsai., 1994; Satterlie és Norekian, 1996). Ilyen neuronhálózat például a táplálkozást, menekülést vagy mozgást szabályozó rendszer, ahol az 5-HTerg sejtek belső serkentést kiváltva a hálózat mintázatgenerálásában vesznek részt, aminek következtében megjelenik a sztereotipikus motoros mintázat (Mackey és mtsai., 1989; Gillette és Jing, 2001; Jing és Gillette, 2000; Jing és Gillette, 2003). A hálózatok 5-HTerg sejtjei érző afferens bemenetekkel rendelkeznek, valamint az általuk modulált hálózattól is kapnak szinaptikus visszacsatolást. A legismertebb 5-HT tartalmú neuronpár csigákban a táplálkozási rendszer központi mintázatgenerálója a cerebrális óriássejt pár (CGC, MGC, C1), amelynek aktivitása hat

a táplálkozás kezdeti szakaszára, illetve szabályozza a táplálkozás motoros programját (Granzow és Kater, 1977; Pentreath és mtsai., 1982; McCrohan és Audesirk, 1987; Yeoman és mtsai., 1996). Az 5-HT résztvesz a memória kialakításában és a tanulás folyamatában (Byrne és mtsai., 1991, Bailey, és Kandel, 1993; Nelson és Alkon, 1997; Kemenes és Benjamin, 1989; Yamanaka és mtsai., 2000). A csigák 5-HTerg interneuronjai mellett efferens 5-HTerg neuronok is találhatóak, melyek a KIR-ből kilépve a perifériás szöveteket behálózó nyúlványaikkal közvetlenül is szabályoznak egyes élettani folyamatokat és viselkedés formákat. Buckett és mtsai. (1990b) két motoros neuront (Hhe és She) azonosítottak a *Lymnaea* KIR-ében, melyek serkentik a szív működését. A *Helix* gyomor-bélrendszere gazdagon innervált 5-HT-IR kötegekkel, amelyek a központi ganglionokból indulnak ki és a gasztrointesztinális rendszer kívülről érkező (extrinsic) elemei (Hernádi és mtsai., 1998). A *Helixben* az 5-HT gátolja a bél spontán kontrakcióját, tehát fontos szerepe van a gyomor motilitás szabályozásában (Lehman és Greenberg, 1987; Hernádi és mtsai., 1998). Az 5-HT nem csak a bélizomzatra fejt ki modulátoros hatást, hanem különböző egyéb perifériás izmok kontrakciójának időtartamát is képes növelni vagy csökkenteni (Weiss és mtsai., 1978; Cottrell és mtsai., 1983; Lehman és Greenberg, 1987). A tengeri és édesvízi csigák esetében a talp csillókkal borított hámszöve fontos szerepet játszik az állat mozgásában. Számos megfigyelés támasztja alá, hogy a csigák pedális ganglionjában található 5-HTerg sejtek innerválják a talp csillós hámfelületét, és az 5-HT szabályozza a csillók aktivitását (Audesirk és mtsai., 1979; McKenzie és mtsai., 1998; Jiang és mtsai., 1998). Félintakt preparátumokon végzett kísérletekkel bebizonyították, hogy a *Lymnaea* pedális ganglionjában elhelyezkedő úgynevezett „A” csoport sejtjeinek ingerlése kiváltja a csiga csúszó mozgását, szabályozva a talpat beborító csillók intenzívebb mozgását, valamint a talp hám sejtjeinek fokozottabb nyák (mucous) elválasztását (Syed és mtsai., 1988).

## **2.5. Az 5-HT szerepe a *Lymnaea stagnalis* táplálkozásának szabályozásában**

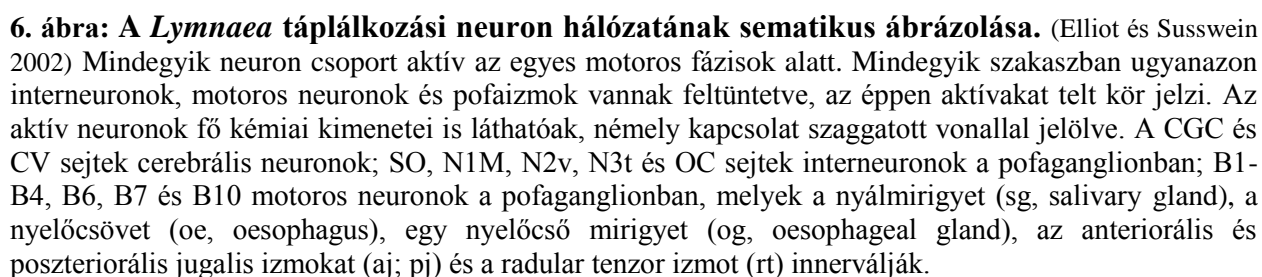
Mielőtt az 5-HT táplálkozásban betöltött szerepével foglalkoznánk, röviden bemutatom a *Lymnaea* táplálkozását, annak idegi és végrehajtó részeit. A táplálkozás hasonlóan más motivált viselkedéshez, két fázisra osztható: az appetitív és a konzummatív szakaszokra (Chase, 2002; Elliot és Susswein, 2002). Az appetitív szakasz során az állat a motiváció (éhség) hatására törekszik a jóllakottság elérésére. Ez elsődlegesen a táplálékkeresést foglalja magába. A konzummatív fázis nagymértékben olyan sztereotip viselkedést jelent, amely végeztével a belső

egyensúly helyreáll. Az appetitív szakasz elején a táplálék fellelésében kizárólag szag információk segítik a csigát. A táplálék helyének végső lokalizációjában a kemoreceptorok szerepe lecsökken, de ismét megnő a következő konzumatív szakasz elején. Az ajak területét két cerebrális ideg innerválja. A felső ajakideg a száj középső részét, míg a középső ideg a száj körüli perifériás területeket idegzi be. Az előbbi a kémiai jelek felfogásán keresztül elősegíti a konzumatív szakaszt, míg a másik mechanoszenzoros jelek felfogásával a táplálék megelégszében játszik szerepet. A konzumatív szakaszt a pofaganglionban képződő motoros parancsok irányítják. A táplálék fogyasztása a pofaizomzat négy különböző típusú mozgásának vagy fázisának ismétlődő sorozatából áll (5. ábra). A ciklusok között eltérő hosszúságú nyugalmi szakaszok fordulnak elő. A ciklus elején az állat kinyitja a száját és kinyújtja az odontophort vagy más néven radula párnáját. Ez egy porcából és izomból álló komplex szerv, melyhez a csiga reszelőnyelve (radula) csatlakozik. Feladata a radula megfelelő pozícióba igazítása a táplálék reszeléséhez és a táplálékdarabok nyelőcső felé történő továbbításához. A második fázis az odontophor kinyújtásával egyidejűleg a radula kiöltése, mely túlnyúlik az odontophor hegyén.



**5. ábra: A: A táplálkozás négy fő fázisa *Lymnaea*-ban.** A pofarégió izomzata elsősorban az elülső és hátsó jugalis pofaizomzat (aj, pj) és a radula tenzor (rt) – összehúzza, megcsavarja és megforgatja az odontophort (OD). A radulát (R) számos fogszerű képlet borítja, a táplálékból ezek segítségével apró darabokat reszel le. M: száj (mouth) (módosítva Benjamin és Elliot, 1989. után). **B: A pofarégió sematikus ábrázolása** (módosítva Rose és Benjamin, [1979] után). CG – cerebrális, BG – bukkális ganglion, ck – cerebrális kommissúra, aj - anterior jugalis izomköteg, dlp – dorsolaterális protractor izomköteg, pj – poszterior jugalis izomköteg. Aránymérték: 700 µm

A *Lymnaea* miközben a leveleket vagy az algabevonatot „legeli”, pofaizomzatát előre és hátra mozgatja. Eközben a fej oldalirányba, míg az állat teste előre mozog. A bukkális massa előre hátramosztatását 46 izom segítségével képes a csiga létrehozni. A legtöbb izom párosan van jelen és összerendezett mozgásukat mindkét pofaganglionban közel 400 neuron irányítja. A táplálkozás során megnyilvánuló ritmikus mozgásokat úgynevezett „command” neuronok váltják ki, melyek a cerebrális ganglionban találhatóak és nyúlványokat küldenek a pofaganglionba (Elliot és Susswein, 2002). Ezek a cerebrális ventrális sejtek (CV1), a cerebrális bukkális sejtek (CB) és a cerebro-bukkális interneuronok (CBI). Amikor a táplálék az ajkakhoz ér, ezek a sejtek ingerületbe jönnek (6. ábra)



Az interneuronok elektromos és kémiai kapcsolatban állnak a pofaizmokat beidegző motoros neuronokkal, melyektől visszacsatolást kapnak. Az interneuronok szinaptikus kapcsolatai elektrofiziológiai adatok alapján feltételezhetően monoszinaptikusak. A ritmus generálását az Slow Oscillator (SO) interneuron indítja a hálózatban. Mind a motoros mind az N csoport interneuronjai bilaterálisan párban helyezkednek el a két pofaganglionban, kivéve az SO-t, mely egyedtől függően hol a jobb hol a bal pofaganglionban található. A CPG (központi mintázatgenerátor) magja három interneuron csoportból áll, melyeket N1, N2 és N3 jelölnek. A motoros program első fázisát (radula kiöltése) az N1 sejtek tüzelése hajtja. A reszelő szakaszt az N2 sejtek, míg a nyelési fázist az N3 sejtek tüzelése biztosítja. A táplálkozási neuronhálózatban főleg monoszinaptikus idegi kapcsolatok fordulnak elő a táplálkozás összes szakasza során. (Benjamin és Elliot, 1989). A táplálkozás ugyanazon fázisában az aktív interneuronok egymással gyakran elektromosan vagy kémiaileg kapcsolak. Az eltérő szakaszban aktív neuronok között gyakran gátló kapcsolat van. A pofaganglion irányítja a pofaizomzat mozgását, a cerebrális ganglionok (bennük a CGC sejtekkel) az állat elülső testtáját (ide tartozik számos olyan struktúra, amely kapcsolatban van a táplálkozással, mint a láb rostrális része, a fej, az érzékelő tapogatók, az ajkak és a száj) vagy a külső pofaizmokat idegzik be. Ezek a ganglionok a KIR többé részével is kommunikálnak.

A CGC sejtek, mint extrinsic modulátor interneuronok, a táplálkozási mintázatgenerátor egyetlen 5-HTerg neuron párja, ami része a táplálkozási neuronhálózatnak. Elektrofiziológiai és anatómiai vizsgálatok szerint a két CGC sejt úgy funkcionál, mint egy egyedülálló kétoldali szimmetriával rendelkező működési egység, potenciálisan képesek azonos hatások kifejtésére az általuk beidegzett sejteken a KIR mindkét oldalán (McCrohan és Benjamin, 1980b). Szinkron aktivitásuk főleg a két sejt között fennálló elektromos kapcsolatnak köszönhető, de ezt tovább erősíti a közös szinaptikus bemenetük is. A bal CGC axont küld a bal laterobukkális és a bal ventrobukkális idegekbe, továbbá axont küld a posztbukkális idegbe és a bal dorzobukkális idegbe is. A jobb CGC hasonló nyúlványrendszerrel rendelkezik. A CGC sejtek igen kiterjedt finom arborizációval rendelkeznek a cerebrális ganglion neuropiljében, ami a cerebrális idegekből beérkező szenzoros ingerek integrálásának a helye lehet. A *Lymnaea* cerebrális ganglionjában elhelyezkedő CGC sejt lézeres eltávolítása után az izolált KIR-ben lelassult a fiktív táplálkozás és megemelkedett a harapások között eltelt idő hossza (Yeoman és mtsai., 1994a). A hamis transzmitter 5,6-hidroxitriptamin injektálása *Lymnaea*-ban lecsökkentette a táplálkozás aktivitását és ezzel párhuzamosan az 5-HT szint csökkenése is észlelhető volt a kezelt egyedekben 12-18 nap elteltével. Az aktivitás csökkenése a rövidebb ideig tartó harapások

és a hosszabb harapások közötti időszakban mutatkozott meg (Kemenes és mtsai., 1990). A CGC a táplálkozási hálózat szinte minden tagját innerválja és serkentőleg hat rájuk (Straub és Benjamin, 2001). A cerebrális ganglion óriássejtje nemcsak a hálózat tagjaival áll kapcsolatban, hanem axonjai a pofarégió izomzatát közvetlenül is beidegzik (Pentreath és mtsai., 1982), így az idegvégződésekből felszabaduló 5-HT hat a táplálkozásban résztvevő izmokra is. Ez arra utal, hogy a CGC/MGC számos egymást követő szinten képes hatni a táplálkozási folyamatokra; egyrészt a szenzoros neuronokra, más modulátor interneuronokra, a központi mintázatgenerátor interneuronjaira és motoros neuronokra. Mindez a modulátoros folyamatok halmozódásához vezet. A moduláció magába foglalja a membrán potenciál megváltoztatását, változást a szinaptikus jelátvitelben, az ingerelhetőségben, vagy az izmok serkentő-kontraháló kapcsolataiban.

## **2.6. Az 5-HT receptorok típusai**

Az 5-HT sokrétű fiziológiai hatását különböző receptoraival való kölcsönhatás révén fejti ki. Gerincesekben korábban négyféle 5-HT receptor típust, az 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, és az 5-HT<sub>4</sub> receptorokat különböztették meg (Saudou és Hen, 1994). Újabb receptor klónozások azonban már másik három 5-HT receptor altípus, az 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub> jelenlétét igazolták. Jelenleg 14 5-HT receptort különböztetnek meg, melyeket hét osztályba sorolnak, és ezzel a neurotranszmitter receptorok legkomplexebb családját alkotják (Glennon és mtsai., 2000; Hoyer és mtsai., 2002; Pauwels, 2003). Az 5-HT receptorok sokféleségét jelzi, hogy újabban csak az 5-HT<sub>2</sub> receptor öt, az 5-HT<sub>3</sub> receptornak pedig három különböző altípusát írták le (egyik közülük korábban az 5-HT<sub>1C</sub> receptor volt). Az egyes receptorok altípusainak fiziológiai tulajdonságai is igen összetettek, így a mai napig is intenzív kutatás folyik az egyes receptorok jellemzőinek alaposabb megismerése érdekében. Az 5-HT receptorok G-protein kapcsoltak és hét transzmembrán doménnel rendelkeznek, ez alól csak az 5-HT<sub>3</sub> receptor a kivétel, ez ugyanis ligand aktivált ion csatorna (Saudou és Hen, 1994). Az egyes 5-HT receptorok előfordulását illetve az általuk közvetített fiziológiai hatásokat foglalja össze az 1. táblázat.

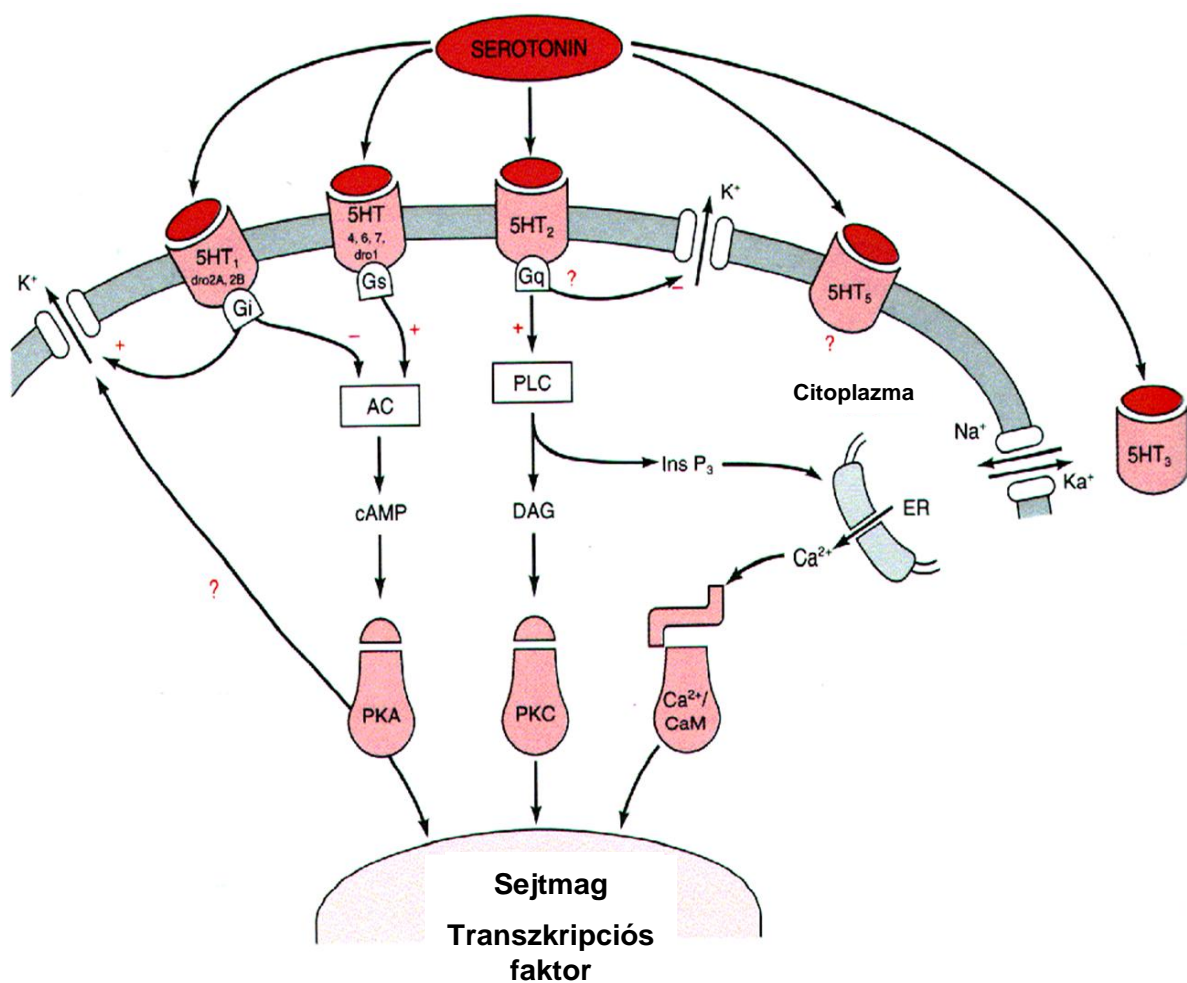
Az 5-HT<sub>1</sub> csoportba tartozó 5-HT receptorok a simaizom relaxációs folyamataiban, a szívizmot és ereket felépítő simaizom kontrakciójában, valamint a neurotranszmitter felszabadulás gátlásában játszanak szerepet, főleg a központi idegrendszerben. Emberben 4 altípus, az 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1C</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> receptorok játszanak fontos szerepet. Celluláris



hatásukat a cAMP gátlásával érik el (7. ábra). Az 5-HT<sub>2</sub> receptorok főleg az eret felépítő simaizomban, vérlemezkékben, tüdőben, a központi idegrendszerben és a gyomor-bélrendszerben található. Szerepük a gyomrot, bélizomzatot és az ereket felépítő simaizom kontrakcióban, a vérlemezkék aggregációjában, hipertenzióban, migrénben és neuronális depolarizációban van. Mivel ezek a receptorok ugyanolyannak tűnnek, mint az 5-HT<sub>1C</sub> altípus, ezért ismét 5-HT<sub>2A</sub> receptoroknak nevezik. Aktiválódása után növeli az inozitol-trifoszfát (IP<sub>3</sub>) és a diacilglicerol (DAG) szintjét (7. ábra). Az 5-HT<sub>3</sub> receptorok elsősorban a perifériás és központi neuronokban találhatóak, a perifériás neuronok depolarizációjáért felelősek. Ezek a receptorok nagyon fontosak a gyógyszerkutatás szempontjából, hiszen ezeken keresztül hatnak a szorongást és a migrént, valamint a különböző kognitív és pszichotikus betegségeket gyógyító gyógyszerek. Az ebbe a receptor családba tartozó receptorok nem G-protein kapcsoltak, hanem maguk képeznek ligand-kapcsolt Na<sup>+</sup> és K<sup>+</sup> kationcsatornákat (7. ábra). Az 5-HT<sub>4</sub> receptor volt az első olyan 5-HT receptor, melyről farmakológiai és biokémiai kísérletekkel bebizonyították, hogy serkentő G fehérjén keresztül pozitívan kapcsolt az adenilát cikláshoz (AC) a KIR-ben, a szívben és a gyomor-béltraktusban. Aktiválódása növeli a cAMP szintjét és ezáltal kiváltja a neurotranszmitter felszabadulást (7. ábra). Az 5-HT<sub>5</sub> receptorok az agykéregben, a hippocampusban és a cerebellumban fordulnak elő. Eddig két 5-HT<sub>6</sub> receptor splice variánst különböztettek meg. Az egyik a teljes hosszúságú (440 aminosav) 5-HT<sub>6</sub> receptor, mely a limbikus és az extrapiramidális agyi területeken expresszált erősen. A másik a „csonka” 5-HT<sub>6</sub> receptor (289 bázispárral kevesebb), mely a nucleus caudatusban és substantia nigra-ban található meg. Valószínűsíthető, hogy szerepük van a pszichiátriai betegségek pathogenezisében. 5-HT<sub>7</sub> receptor 445 aminosav hosszúságú, mely a nem vaszkuláris simaizom elemekben és a KIR-ben expresszálódik. Serkentés hatására G proteinen keresztül pozitívan kapcsolódik az AC-hoz, és így növeli a cAMP szintet.

Az 5-HT receptorokkal kapcsolatos vizsgálatok gerinctelenekben is a kutatások középpontjában állnak. Az 5-HT fiziológiai hatását gerinctelenekben is a legtöbb esetben egy G-protein kapcsolt rendszeren keresztül fejtik ki. Az első 5-HT receptort 1990-ben klónozták *Drosophila*-ból, és azóta eltelt idő alatt további 11 gerinctelen 5-HT receptort klónoztak (puhatestűek esetében *Lymnaea*-ból és *Aplysia*-ból, nematodáknál *Caenorhabditis*-ből és *Ascaris*-ből). Az 5-HT receptorok farmakológiai profiljának meghatározására számos vizsgálat irányult, melyek révén, hasonlóan a gerinces 5-HT receptorokhoz megkísérelték osztályozni a gerinctelen 5-HT receptorokat. Az eredmények nem egyértelműek, de általában elmondható, hogy 5-HT<sub>1</sub> és 5-HT<sub>2</sub>-szerű altípusok léteznek (Peroutka és Snyder, 1979), melyeknek további alcsoportjait

írták le. Minthogy a gerinctelen 5-HT receptorokat klónozták, lehetőség nyílt összehasonlítani azok aminosav szekvenciáit és farmakológiai tulajdonságait a gerinces 5-HT receptorokkal. Csiga és rovarszöveten is végeztek 5-HT receptorokkal kapcsolatos vizsgálatokat, melynek eredményeként négy különböző *Drosophila* 5-HT receptort (5-HT<sub>dro1</sub>, 5-HT<sub>dro2A</sub>, 5-HT<sub>dro2B</sub> és az 5-HT-2dro; Witz és mtsai., 1990; Colas mtsai., 1995), kétféle *Lymnaea* 5-HT receptort (5-HT<sub>Lym1</sub> és 5-HT<sub>Lym2</sub> receptor; Sugamori és mtsai., 1993) és két *Aplysia* 5-HT receptor típust (Ap5-HT<sub>B1</sub> és Ap5-HT<sub>B2</sub>; Li és mtsai., 1995) azonosítottak.



**7. ábra: Az 5-HT receptorok családja és posztzinaptikus jelátviteli útjai** (Randall és mtsai., 2002.)  
AC – adenilát-cikláz, PLC – foszfolipáz C, Gi – inhibitoros G fehérje, Gs – serkentő G fehérje, DAG – Diacil-glicerol, ER – endoplazmás retikulum

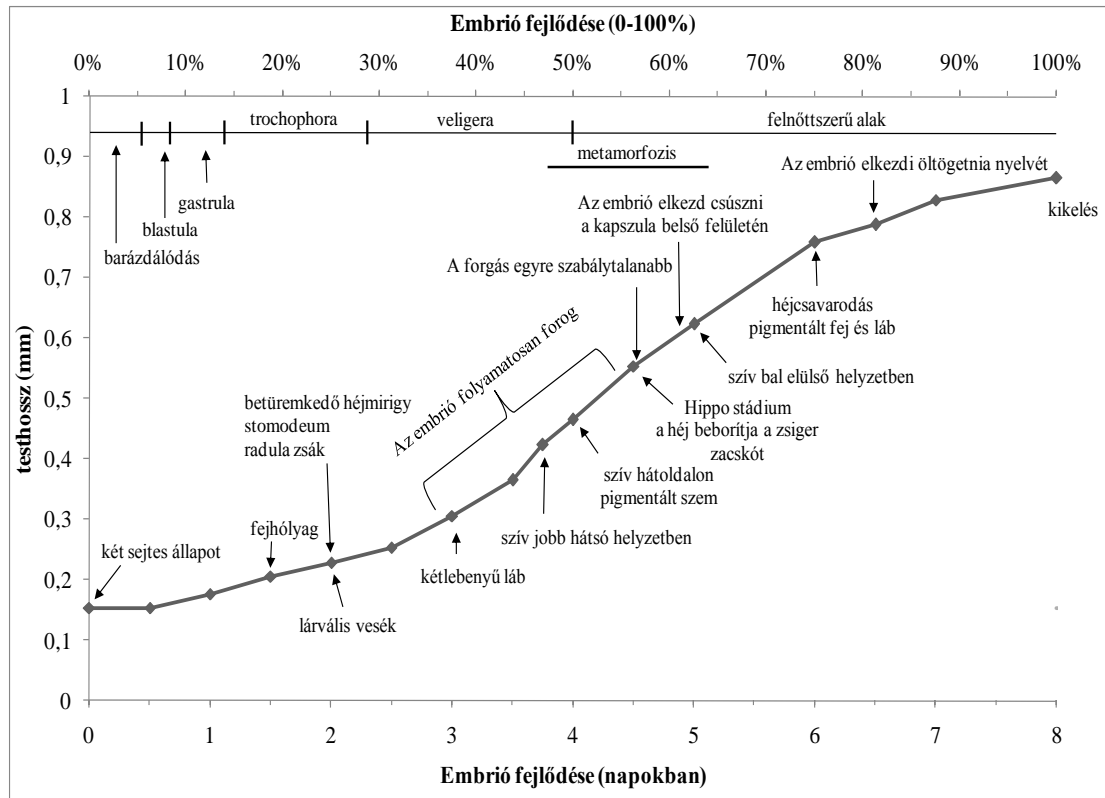
Receptor	Előfordulás/ Hatás	Agonisták	Antagonisták
<b>5-HT<sub>1A</sub></b>	CNS: neuronális gátlás, magatartási hatások (alvás, emésztés, hőszabályozás, szorongás)	buspirone	spiperone, methiothepin, ergotamine, yohimbine
<b>5-HT<sub>1B</sub></b>	CNS: preszinaptikus gátlás; magatartási hatások; vasculáris: pulmonáris vazokonstrikció	ergotamine, sumatriptan	methiothepin, yohimbine, metergoline
<b>5-HT<sub>1D</sub></b>	CNS: helyzetérzékelés; vasculáris: cerebrális vazokonstrikció	sumatriptan	methiothepin, yohimbine, metergoline, ergotamine
<b>5-HT<sub>2A</sub></b>	CNS: neuronális excitáció, magatartási hatások, tanulás; simaizom kontrakció, vazokonstrikció / dilatáció; vérlemezke aggregáció	$\alpha$ -methyl-5-HTT, LSD (CNS)	ketanserin, cyproheptadine, pizotifen, LSD (PNS)
<b>5-HT<sub>2B</sub></b>	gyomor: kontrakció	$\alpha$ -methyl-5-HT, LSD (CNS)	yohimbine, LSD (PNS)
<b>5-HT<sub>2C</sub></b>	CNS, choroid plexus: cerebrospinal folyadék (CSF) szekréció	$\alpha$ -methyl-5-HT, agomelatine, LSD (CNS)	mesulergine, agomelatine, LSD (PNS)
<b>5-HT<sub>3</sub></b>	CNS, PNS: neuronális excitáció, szorongás	2-methyl-5-HT	metoclopramide (nagy dózisban), renzapride, ondansetron, alosetron,
<b>5-HT<sub>4</sub></b>	GIT, CNS: neuronális excitáció, gastrointestinalis motilitás	5-methoxytryptamine, metoclopramide, renzapride, tegaserod	GR113808
<b>5-HT<sub>5A</sub></b>	CNS (cortex, hippocampus, cerebellum): ismeretlen	5-carboxytryptamine (5-CT); LSD (részleges agonista)	SB269970
<b>5-HT<sub>6</sub></b>	CNS: ismeretlen	LSD, metergolin	SB258585
<b>5-HT<sub>7</sub></b>	CNS, GIT, véredénykék: ismeretlen	5-carboxytryptamine (5-CT), LSD, 8-OH-DPAT, metergolin	Methiothepin, SB269970

**1. táblázat: A gerinces 5-HT receptorok típusai, előfordulásuk, tulajdonságai és agonistáik/antagonistáik (Pauwels, 2003).**

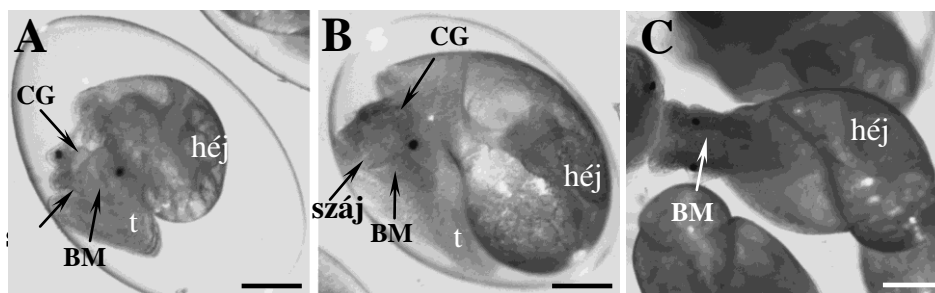
*Drosophilában* az 5-HT receptor mRNS-t az agyban és a hasdúcban, *Lymnaeában* az agyban, főleg az úgynevezett világoszöld sejtekben (LGCs) és a szívben, míg *Aplysiában* az agyban és a szaporító szervrendszerben azonosították. Az 5-HT<sub>dro-1</sub> receptort 564 aminosav építi fel és homológiát mutat a gerincesek G-protein kapcsolt 5-HT receptoraival. Valószínű, hogy rovarokban ennek a receptornak szerepe az AC aktiválása révén a biológiai ritmus szabályozásában van (Saudou és Hen, 1994). Az 5-HT<sub>dro-2A</sub> receptort 834, míg az 5-HT<sub>dro-2B</sub> receptort 645 aminosav építi fel. Mindkettőnek nagy homológiát mutat a transzmembrán domén régiókon belül. Az 5-HT<sub>dro-2A</sub> gátolja az AC aktivitást. Szerepe valószínűleg a motoros szabályozásban van. Az 5-HT<sub>dro-2</sub> a gerinces 5-HT<sub>1</sub> receptorral, míg az 5-HT<sub>dro-1</sub> az 5-HT<sub>7</sub> receptorral homológ. 5-HT<sub>2dro</sub> receptort 868 aminosav építi fel, hét transzmembrán szerkezet jellemzi. A *Lymnaea* 5-HT<sub>1</sub> receptort 509 aminosav építi fel, hét hidrofób transzmembrán szerkezet jellemzi (Sugamori és mtsai., 1993) és a legnagyobb homológiát a *Drosophila* és az emlős 5-HT<sub>1</sub> receptorral mutatja. Az 5-HT<sub>dro-2B</sub> receptorral 61%-os a homológiája a transzmembrán doménen belül. A *Lymnaea* 5-HT receptornak van egy harmadik citoplazmatikus hurka és egy rövid C-terminális vége is. Ez a szerkezet azokra a receptorokra jellemző, melyek G-proteinen keresztül az AC-t gátolják. A *Lymnaea* 5-HT<sub>2</sub> receptora szerkezetileg és funkcionálisan is az emlős 5-HT<sub>2</sub>-es receptorra hasonlít. Szerkezetére a hét hidrofób transzmembrán szerkezet a jellemző. A gerinces 5-HT<sub>2</sub> receptorhoz hasonlóan, aktivációjakor a foszfolipáz C-t stimulálja. A KIR-ben csak nagyon kis mértékben fordul elő; elsősorban a perifériás szervekben, mint pl. a szívben, nyelőcsőben, nyálmirigyben és a spermoviductusban expresszálódik. Az Ap5-HT<sub>B1</sub> és Ap5-HT<sub>B2</sub> receptorokat Li és mtsai. (1995) klónozták *Aplysiá*-ból. Hét transzmembrán szerkezet jellemzi őket és nagy homológiát mutatnak egymással (79,5%). Ha csak a transzmembrán régiót vizsgáljuk, akkor az aminosav homológia 90%. A 45 kDa molekulásúlyú Ap5-HT<sub>B1</sub> receptort 453 aminosav, míg a 42 kDa molekulásúlyú Ap5-HT<sub>B2</sub> receptort 422 aminosav építi fel. Ap5-HT<sub>B1</sub> receptornak van egy viszonylag rövid, harmadik intracelluláris hurka és egy hosszú C terminális vége, mely a foszfolipáz C kapcsolt receptorok jellemzői. Ap5-HT<sub>B1</sub> receptor a reprodukív szervekben, míg az Ap5-HT<sub>B2</sub> receptor a KIR-ben expresszálódik.

## 2.7. A *Lymnaea stagnalis* egyedfejlődése

A nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) a megtermékenyítést követően két-háromszáz petét tartalmazó petezsákot rak le. A csiga egyedfejlődése a petezsákon belül egy zárt, szikanyaggal teli glikoproteid petekapszulában/tokban zajlik le a zigóta fejlettségi állapottól a kifejlett forma eléréséig. A folyamat 24°C hőmérsékleten körülbelül nyolc napig tart. Az elmúlt évtizedekben jelentős ismeretanyag gyűlt össze ezen édesvízi csigafaj morfo- és organogenezisééről (Raven, 1966; Morill, 1982; Mescheryakov, 1990). A *Lymnaea* embrionális fejlődésének számos jellemzője alkalmassá teszi a fajt embriológiai vizsgálatok végzésére. Az állat tartása egyszerű, könnyen szaporítható, az embrió fejlődése az átlátszó peteburkon belül jól nyomon követhető. Az embrionális fejlődés egyes stádiumai jól beazonosíthatóak az embriók mérete, egyes szervek (pl. szív), testrészek megjelenése, egyes perifériás területek (szem, kültakaró) pigmentációjának kezdete, valamint egyes viselkedési formák megjelenése (forgó, csúszó mozgás, reszelőnyelv kitűrés) alapján (8. ábra). Az embrionális fejlődési állapotokat (E) a fejlettség százalékában szokás megadni, ahol az E0% az első barázdálódásnak, az E100% pedig a tokot elhagyó, kifejlett egyednek felel meg (Mescheryakov, 1990). A késői embriogenezis során készült *in vivo* képek a 9. ábrán láthatók. A kapszulából kikelő juvenilis állat testfelépítésében megegyezik a felnőtt állattal (8C ábra). Elterést a felnőtt formától a test méretében mutat, emellett a tokot elhagyó egyedek ivaréretlenek (juvenilis egyedek). A kikelést követő 2-3 hónap során, a P5-P6 poszt embrionális állapotban válnak ivaréretté. A különböző lárva állapotokat (trochophora, vagy csillókoszorús- és veligera, vagy vitorlás lárva) követő átalakulás (metamorfózis) során az egész test meghajlik (flexió), illetőleg elcsavarodik (torzió), ezek a folyamatok alakítják ki a felnőtt állatok anatómiájának és testszimmetriájának „rendszeretlen” vonásait.



**8. ábra: A nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) egyedfejlődésének, valamint morfo- és organogenezisének főbb szakaszai, és egyes magatartásformák megjelenésének időpontja.** (módosítva Morrill 1982 után).



**9. ábra: E60% (A), E90% (B) embriók és kikelő (C) *Lymnaea* képe.** CG- cerebrális ganglion, BM- pofaizomzat, t- talp. Aránymérték: 300  $\mu$ m.

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Az irodalmi áttekintés alapján egyértelmű, hogy az 5-HT fontos szerepet tölt be a Gastropoda fajok táplálkozási magatartásának szabályozásában. Habár a csigák KIR-ében az 5-HTerg neuronok neurokémiaja, kémiai-neuroanatómiája, továbbá a táplálkozás szabályozásának neuronális háttere részletesen tanulmányozott, csak kevés információval rendelkezünk a táplálkozás effektor szerve, a pofaizomzat 5-HTerg szabályozásáról és működéséről, azok funkcionális morfológiai és élettani-biokémiai alapjairól. Munkánk célja ezért az volt, hogy immuncitokémiai, neurokémiai és fiziológiai-farmakológiai módszerek segítségével részletesen elemezzük a fejlődő és a kifejlett *Lymnaea stagnalis* pofarégiójában az 5-HT-IR innervációt és így feltárjuk a táplálkozási magatartás egyes szerkezeti és élettani aspektusainak hátterét.

Célul tűztük ki, hogy

- (i) jellemezzük az 5HT-IR idegelemek szerveződését a fejlődő (embrionális és posztembrionális), illetve felnőtt *Lymnaea*-ban, különös tekintettel a táplálkozási rendszer (pofaizomzat) efferenciájára;
- (ii) ultrastrukturális szinten jellemezzük a pofaizomzat fejlődését és annak általános és 5-HT-IR innervációját az egyedfejlődés során;
- (iii) feltárjuk a *Lymnaea* pofaizomzat 5-HTerg innervációjának egyes neurokémiai jellemzőit;
- (iv) részletesen vizsgáljuk a táplálkozási ritmus (reszelőnyelv mozgatás) 5-HTerg szabályozásának fiziológiai-farmakológiai hátterét és azonosítsuk a folyamatban résztvevő 5-HT receptorokat.

Várható eredményeinkkel teljesebbé kívántuk tenni az 5-HTerg rendszer szabályozó szerepére vonatkozó ismereteinket gerinctelenekben, különös tekintettel a Gastropoda fajok táplálkozására. Továbbá új adatokat kívántunk szolgáltatni az 5-HTerg rendszernek az idegrendszerben betöltött általános szerepével kapcsolatosan is.

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. Kísérleti állatok

A nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) felnőtt egyedeit a Kis-Balaton csatornáiból gyűjtöttük tavasztól-őszig, majd laboratóriumi akváriumokban tartottuk és neveltük őket tovább. Az akváriumokba a vizet a Balatonból nyertük, melyet folyamatos levegőztetés mellett hetente cseréltünk. A víz hőmérsékletét 20-25 °C-on tartottuk. A juvenilis és felnőtt egyedeket heti rendszerességgel salátával etettük. Az így tartott mocsári csiga állomány folyamatosan biztosította a munkánkhoz szükséges petezsák mennyiséget. Morrill (1982) és Mescheryakov (1990) megfigyelései alapján az embriók fejlődési állapotát a specifikus morfológiai, morfometriai és viselkedésszerű tulajdonságok megjelenése alapján határoztuk meg. A fejlődési állapotokat a teljes embrionális fejlődés százalékában fejeztük ki, melyben a E0% az első sejtosztódásnak, míg a E100% a kikelésnek felel meg (8. ábra, Marois és Croll; 1992). A juvenilis (posztembrionális stádiumú) egyedek meghatározása pedig Croll és Chiasson (1989) módszerével történt (P1-P5 stádiumú egyedek: juvenilis, P6 stádiumú egyedek: felnőtt). Kísérleteink során mindvégig arra törekedtünk, hogy csak a minimálisan szükséges számú állattal dolgozzunk.

### 4.2. Immunhisztokémia

#### 4.2.1. Preparálás és szövet előkészítés

Vizsgálatainkhoz E60%, E80%, E90% E100%-os fejlettségi stádiumú embriókat, kikelő (hatching), P1, P2, P3 stádiumú posztembrionális, és felnőtt csigák egyedeit használtuk.

Az embriókat a petezsákból és tojásból eltávolítottuk, majd a héj kezdeményt és a vizszerális testrészt levágtuk. A kriosztát metszeteken végzett fénymikroszkópos vizsgálatainkhoz minden esetben a teljes feji régiót tanulmányoztuk. Lézer konfokális vizsgálatainkban az E80%-os fejlettségi stádiumot elért embrióktól kezdve a teljes feji régió fixálása után kipreparáltuk a pofaizomzatot. A posztembrionális stádiumú (juvenilis) csigák házát dorzálisan leválasztottuk, ezzel szabaddá téve a feji régiót, majd ezt követően levágtuk a talpat és így lehetővé vált a pofaizomzat kipreparálása. Felnőtt egyedeknél az állatok feji régióját a ház levágása után preparáló tálban rögzítettük, majd a pofaizomzat és a KIR-t kipreparáltuk. A



preparálások során *Lymnaea* fiziológias oldatot használtunk (összetétel mM-ban: 80 NaCl, 4 KCl, 10 CaCl<sub>2</sub>, 5 Mg Cl<sub>2</sub>, 10 TRis-HCl, desztillált vízben oldva, pH=7.4).

#### **4.2.2. Fixálók**

1. Kriosztát metszeteken végzett fénymikroszkópos vizsgálatainkhoz a preparátumokat 4% paraformaldehidet (PFA) tartalmazó foszfát pufferben (PB, 0.1 M, pH=7.4) fixáltuk szobahőmérsékleten 4 órán vagy 4°C-on 16 órán (egy éjszakán) át. Rögzítés után a preparátumokat többször mostuk (3x10 perc) foszfát pufferelt fiziológias sóoldatban (PBS). Lézer konfokális mikroszkópos vizsgálatok esetében a fixálás után a mintákat Triton X-et tartalmazó PBS-ben (PBS-TX) mostuk, majd egy éjszakán át 4°C-on PBS-TX-ben tartottuk.

2. Elektronmikroszkópos vizsgálatainkhoz a preparátumokat 4% PFA-t és 0.08-0.1% glutáraldehidet (GA) tartalmazó 0.01 (embriók) vagy 0.1M-os (juvenilis és felnőtt állatok) PB-ben (pH=7.4) fixáltuk szobahőmérsékleten 4 órán vagy 4°C-on 16 órán át (egy éjszaka). Az alacsony (0.01 M) puffer koncentráció alkalmazása volt az alapfeltétele annak, hogy az embrionális stádiumban a pofaizomzat finomszerkezetét jól megőrizzük (Nagy és Elekes, 2000). Fixálás után a mintákat 3x10 percen át PB-vel mostuk, majd utófixáltuk őket 1% OsO<sub>4</sub>-ot tartalmazó 0.1 M Na-cacodylat-pufferben 1 órán keresztül 4°C-on.

#### **4.2.3. 5-HT immuncitokémia**

Az általunk alkalmazott módszerek az indirekt kétlépéses (fluoreszcens festékekkel vagy peroxidázzal kapcsolt IgG) vagy a háromlépéses avidin-biotin komplex (ABC) eljárás elvén alapultak.

##### **4.2.3.1. Epifluoreszcens immunhisztokémia**

A rögzített mintákat, 1 órán át 20%-os, PBS-ben oldott szacharóz oldatban szobahőmérsékleten tartottuk, majd Tissue Tek fagyasztóközegbe ágyasztuk. Ezután kriosztátban -18 °C-on fagyasztottuk őket és 16 µm-es sorozat metszeteket készítettünk, melyeket Cr-Al-zselatinnal fedett tárgylemezre vettünk fel. A metszetkészítés után 1 órán át 0.25% BSA-t és 0.25% TX-et tartalmazó PBS (PBS-TX-BSA) oldattal blokkoltunk. A metszeteket vagy a totál preparátumokat (whole mount) 0.25%-os PBS-TX-BSA-ban 1:500 arányban hígított egérben termeltetett monoklonális anti-5-HT antitesttel (Dako) inkubáltuk 72 órán át 4°C-on vagy 24 órán át szobahőmérsékleten. Ezt követően a preparátumokat 3x10 percig PBS-TX-el mostuk,

majd sötétben szobahőmérsékleten 4 órán vagy 4°C-on 16 órán keresztül inkubáltuk fluoreszcein izotiocianáttal (FITC, Dako) vagy tetraetilrodamin izotiocianáttal (TRITC, Dako) kapcsolt egér ellen termeltetett másodlagos antitesttel, melyet 1:50 arányban hígítottunk 0.25%-os PBS-TX-BSA-ban. A preparátumokat PBS-ben mostuk, majd glicerín és PBS 1:1 arányú keverékével fedtük le és Zeiss Axioplan mikroszkóppal vizsgáltuk. A fényképezéshez Canon PS G5 típusú digitális kamerát használtunk.

#### 4.2.3.2. Lézer konfokális immunhisztokémia

Szövetelőkészítés és fixálás után a pofaizomzat whole-mount preparátumait 0.25% BSA-t, 2,5%-os normál kecske szérumot és 5%-os TX-et tartalmazó PBS-ben 1:2000 arányban hígított poliklonális (nyúl) anti-5-HT antitesttel (Immunostar) inkubáltuk 10 °C-on 48-56 órán át. Ezt követően a preparátumokat 3x10 percig PBS-TX-el mostuk, majd kecskében nyúl ellen termeltetett Alexa 488-al konjugált IgG-t (Molecular Probes) és TRITC-cel konjugált phalloidint egyaránt PBS-TX-ben 1:800 arányban hígított keverékben 10°C-on 12 órán át inkubáltuk. A stádiumonként legalább 15 embrióból származó pofaizomzatokat Leica TCS SPE vagy Leica TCS SP5 lézer konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A vizsgálatok során 0.2-0.5 µm vastagságú optikai szeleteket készítettünk, majd ezekből TIFF file-okat szerkesztettünk.

#### 4.2.3.3. Korrelatív fény- és elektronmikroszkópos immunhisztokémia

A fénymikroszkópos vizsgálatokhoz a fixált mintákból zselatin albuminos beágyazás és 10%-os PFA-s utófixálás után rezgőkéssel (Vibratome) 50 µm vastagságú szövetszeleteket készítettünk. A szeleteket 1 órás 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-os blokkolást követően PBS-TX-BSA-ban is blokkoltuk, majd 0.25%-os PBS-TX-BSA-ban 1:500 arányban hígított monoklonális anti-5-HT antitesttel (Dako) inkubáltuk 24-72 órán át. Ezt követően a szeleteket 3x10 percen át PBS-TX-el mostuk, majd 4°C-on 16 órás inkubáció következett 1:50 arányban hígított, tormaperoxidázzal (HRP) kapcsolt másodlagos IgG antitesttel. Az immunhisztokémiai reakciót sötétben 0.05 M Tris-HCl pufferben (pH: 7.6) oldott 0.05% 3,3-diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB, Sigma) kromogénnel 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> szubsztrát jelenlétében hívtuk elő. Az 1% OsO<sub>4</sub>-os 0.1 M Na-cacodylat-pufferelt utófixálás után a preparátumokat növekvő koncentrációjú etilalkohol sorozatban, majd propilén oxidban víztelenítettük. A víztelenítés során 70%-os alkoholban 30 percen át telített uranil-acetáttal blokkfestést végeztünk. A dehidrált szöveteket propilénoxid és Araldit (Durcupan ACM, Fluka) 3:1, 1:1, 1:3 térfogatarányú keverékével infiltráltuk, majd Aralditba ágyaztuk. 48 órás polimerizáció után 1 µm-es félvékony, illetve gyémánt késsel (LKB

Nova ultramikrotóm) 50-60 nm-es ultravékony metszeteket készítettünk. A félvékony metszeteket 1%-os toluidinkék oldattal festettük meg, majd Zeiss Axioplan mikroszkóppal tanulmányoztuk, míg az ultravékony metszeteket ólom-citrát oldattal kontrasztoltuk (Reynolds, 1963) és JEOL 1200EX elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

#### 4.2.3.4. Kontroll kísérletek, specificitás vizsgálatok

##### *Monoklonális anti-5-HT antiszérum*

##### *Szöveti vizsgálatok*

A monoklonális egér anti-human 5-HT antitestet, 5-HT-H209 klón (Dako, M0758) 5-HT és Freund's adjuvant ellen termeltették.

Csiga szövetpreparátumokon négy kontrollkísérletet végeztünk el. 1. Összehasonlítottuk a poliklonális (Immunostar, 1:2000) és monoklonális (Dako, 1:500) anti-5-HT antitestekkel megfestetett csiga pofaizomzatából készült alternáló kriosztát metszeteket. Az 5-HT-IR elemek eloszlásában semmiféle különbség nem tapasztaltunk. 2. Összehasonlítottuk a poliklonális és monoklonális anti-5-HT antitestekkel megfestetett felnőtt *Lymnaea* KIR-ből készült alternáló kriosztát metszeteket is, ahol szintén ugyanazok az 5-HT-IR idegi elemek festődtek (CGC) a két festést követően. 3. *Lymnaea* KIR-ből és pofaizomzatából készült kriosztát metszetek kettős (monoklonális és poliklonális anti-5-HT antitestekkel történt) festését követően egyértelmű volt a CGC és más azonosított 5-HT tartalmú sejtcsoportok, valamint a pofaizomzat innerváló axonkötegek kettős jelölődése. 4. Negatív kontroll kísérletekben az elsődleges antitestet kihagytuk a PBS-TX-BSA oldatból, melyet követően nem észleltünk 5-HT immunreaktivitást.

##### *Western blot vizsgálatok*

*Lymnaea* teljes KIR homogenizátumon Western blot kísérletet végeztünk annak érdekében, hogy megerősítsük a monoklonális anti-5-HT antitest specificitását. Korábban Serfőző és mtsai (2008) a módszert már leírták részletesen. Röviden, monoklonális egér anti-5-HT antitesttel (1:2000), majd anti-egér-HRP konjugátummal (1:2000) megfestettük a teljes KIR homogenizátumot tartalmazó membránt, melyet végül Ni-intenzifikált DAB reakcióval hívtunk elő. Az immunfestést követően pozitív sávok nem voltak megfigyelhetők, a monoklonális anti-5-HT antitest nem ismert fel egyetlen fehérjét sem a *Lymnaea* agyban. Ez azt igazolta, hogy ez az anti-5-HT antitest specifikusnak tekinthető.

### *Poliklonális anti-5-HT antiszérum*

A poliklonális anti-5-HT antitest specificitását már előzetesen preabszorpciós kísérletekkel bizonyították mind *Lymnaea*-ban (Croll and Chiasson, 1989; Marois and Croll, 1992), mind Gastropoda fajokban (Sudlow és mtsai., 1998; Fickbohm és mtsai., 2001).

## **4. 3. Biokémiai vizsgálatok**

### **4.3.1. HPLC technika**

Kísérletenként 10 E90%-os, 10 kikelt (hatchling) és 5-5 P1-P5 juvenilis egyed\* pofaizomzatát preparáltuk ki. A szöveteket 100 µl jéghideg 0.1 normál perklórsavban homogenizáltuk, amely internal standard-ként 1 pmol/µl izoprotenerolt tartalmazott, majd Eppendorf-csőben Teflon dugattyúval folytattuk a homogenizálást, végül 15 sec-os ultrahangos kezeléssel fejeztük be. A homogenizátumot 13000 g-n 10 percig 4°C-on centrifugáltuk, majd HPLC-vel (Milford) mértük az 5-HT koncentrációt a felülúszó aliquot-jában. Az elválasztás 40°C-on Lichrospher 100-5, RP-18 oszlopon (Merck) történt, mozgófázisként 0.1 M PB szolgált, amely 10 % metanolt és 0.1 M oktán szulfonsavat tartalmazott. A detektálásra Coulochem II, ESA elektrokémia detektort használtunk. A méréseket hat alkalommal ismételtük meg.

### **4.3.2. Az 5-HT felvétel mérése**

Az 5-HT felvétel kinetikai analíziséhez a pofaizomzatot alkalmanként két P5 juvenilis egyedből preparáltuk ki, majd azok nedves súlyát meghatároztuk. A pofaizomzatot 1 ml *Lymnaea* fiziológiás oldatban 10 percig, 25°C-on (total felvétel), illetve 0°C-on (nem specifikus felvétel) inkubáltuk, mely 0.1-50 µM 5-hydroxy[<sup>3</sup>H]tryptamine trifluoroacetate ([<sup>3</sup>H]-5HT 4.44 TBq/mmol, GE Healthcare UK Limited) tartalmazott. Az inkubálást Whatman GF/C üvegszálás szűrőn való szűréssel fejeztük be, majd a szűrőn lévő szövetet kétszer 5 ml jéghideg fiziológiás oldattal mostuk. Ezt követően a szövetet üvegszintillációs küvettában 1 ml szövetoldó hozzáadásával 40°C-on víztiszta oldottuk.

---

\* Az állatok fejlettségi stádiumát, amelyekből a mintákat vettük, a mérést tekintve az érzékenység és a preparálható szövetmennyiség határozta meg.

A szövet feloldódása után 10 ml toluen bázisú szcintillációs folyadékot adtunk hozzá, és a radioaktivitást TRI-CARB 2100 TR folyadék szcintillációs készülékkel (PerkinElmer Life Science) mértük. Specifikus felvételnek a teljes felvétel és a nem-specifikus felvétel különbségét tekintettük. A  $\text{Na}^+$ -függő felvétel vizsgálatakor a fiziológiás oldatban a  $\text{Na}^+$ -ot szukrózzal helyettesítettük. Amikor az 5-HT felvételt különböző stádiumú egyedekben (kikelőtől a P6 felnőttig) hasonlítottuk össze egy kísérlethez három pofaizomzatot használtunk. Ezekben a kísérletekben a  $[^3\text{H}]\text{-5-HT}$  koncentrációja  $50\ \mu\text{M}$  volt. A kísérleteket 3 alkalommal, párhuzamosan végeztük.

#### **4.3.3. Az 5-HT felszabadulás mérése**

Három P5 juvenilis stádiumú csiga bukkális pofaizomzatát kipreparáltuk és  $25^\circ\text{C}$ -on 30 percig inkubáltuk 1 ml *Lymanea* fiziológiás oldatban, amely  $2\ \mu\text{Ci}$   $[^3\text{H}]\text{-5-HT}$ -t tartalmazott. Az inkubáció végén a szövetet háromszor mostuk 20 ml hideg fiziológiás oldatban, majd azt egy perfúziós kamrába helyeztük és 15 percen keresztül  $1\ \text{ml/perc}$  sebességgel fiziológiás oldatot áramoltattunk át a felülethez kötött radioaktivitás eltávolítása céljából. Ezt követően 12 frakciót gyűjtöttünk normál fiziológiás oldat áramoltatása közben, 5 frakciót  $100\ \text{mM}$ -ra megemelt  $\text{K}^+$  koncentrációjú fiziológiás oldat, majd 12 frakciót ismét normál fiziológiás oldat áramoltatása közben gyűjtöttünk. A párhuzamos kísérletekben  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes fiziológiás oldatot használtunk, amelyben nem volt EGTA, és a  $\text{Ca}^{2+}$ -ot szukrózzal helyettesítettük. A méréseket háromszor ismételtük meg.

#### **4.3.4. Ligand kötődés vizsgálata membránpreparátumokon**

P5-P6 stádiumú csigák pofaizomzatát kipreparáltuk, mértük azok nedves súlyát és  $40$  térfogat Tris-sósav puffer  $50\ \text{mM}$ ,  $\text{pH}\ 7.4$  Polytron PT10-es homogenizátorral homogenizáltuk. A homogenizátumot reszuszpendálás után egymást követően 4-szer centrifugáltuk  $30000\ \text{g}$ -n  $30$  percig  $4^\circ\text{C}$ -on. A második centrifugálás után a szuszpenziót  $20$  percig  $25^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk. A végső pelletet felhasználásig  $-80^\circ\text{C}$ -on tartottuk. A telítési görbe vizsgálatához  $10\ \text{mg}$  nedves szövettel ekvivalens membrán preparátumot inkubáltunk  $20$  percig  $25^\circ\text{C}$ -on növekvő koncentrációjú  $[^3\text{H}]\text{-5-HT}$  trifluoroacetáttal ( $0.2 - 20\ \text{nM}$ ). A helyettesítési kísérletekben  $5\ \text{nM}$  trifluoroacetátot és a helyettesítő farmakon növekvő koncentrációját alkalmaztuk. Az inkubációt

Whatmann GF/C szűrőn való átszűréssel fejeztük be, majd a szűrőt háromszor mostuk 5 ml hideg Tris pufferrel. A nem-specifikus kötődést 10  $\mu$ M 5-HT jelenlétében határoztuk meg. A szűrőt 10 ml toluol bázisú szcintillációs folyadékban extraháltuk egy éjszakán át, majd mértük a radioaktivitást. A telítési és a helyettesítési kísérleteket háromszor ismételtük meg. Az eredményeket Grafít programmal analizáltuk (Leatherbarrow, 1992).

#### 4.3.5. Adenilát cikláz aktivitás mérése

Az adenilát cikláz (AC) aktivitását és annak változását az 5-HT illetve 5-HTerg farmakonok hatására a cAMP koncentráció pofaizomzatban történő változása révén vizsgáltuk. Az előzetes vizsgálatok azt mutatták, hogy az 5-HT stimulálja az AC aktivitását a juvenilis és a felnőtt csigák pofaizomzatában is, ezért a mérés technika egyszerűsítése kedvéért a kísérletekhez felnőtt állatok pofaizomzatát használtuk. A kipreparált pofaizomzatot előinkubáltuk 250 ml *Lymanea* fiziológiás oldatban 5 percig, amely 0.5 mM adenosin-5-trifoszfátot, 0.1 M guanosin-trifoszfátot és 0.5 M izobutil-metilszantint tartalmazott. 5-HT-t vagy agonistáit adva az elegyedhez az inkubálást további 5 percig folytattuk. A kontroll kísérlet nem tartalmazott sem 5-HT-t, sem agonistát. Agonistaként 5-carboxamidotriptamin (5-CT)-t, 5-metoxitriptamint (5-MET) és 8-hidroxi-2-(di-N-propilamino) tetralint (8-OH-DPAT) használtunk. Az antagonisták gátló hatásának vizsgálatakor az AC aktivitását 100  $\mu$ M 5-HT-val serkentettük. Az antagonisták clozapin, SB258585, clomipramin és doxepin voltak és azokat  $10^{-7}$ - $10^{-4}$  M koncentrációban alkalmaztuk. Az inkubáció végén a pofaizomzatot 2 ml savazott etanolban (100ml etanol/1ml 1 N HCl) homogenizáltuk. A homogenizátum centrifugálása után a felülúszót liofilizáltuk. A liofilizátumot 200  $\mu$ l pufferben (Tris-EDTA; 50 mM; pH 7,5) reszuszpenzáltuk, majd 5 percig 12000 g-n centrifugáltuk. A felülúszó 50  $\mu$ l-éből a cAMP-et a protein kötődés módszerével Amersham cAMP[ $^3$ H] assay Kitet (GE Healthcare UK Limited) használva mértük. A kísérleteket négyszer ismételtük meg.

#### 4.4. Fiziológiai-farmakológiai vizsgálatok

Az 5-HT és különböző 5-HTerg farmakonoknak (2. táblázat) a reszelőnyelv (radula) ritmikus kiöltésére kifejtett hatását késői stádiumú (E100%) embriókban vizsgáltuk. Voronezhskaya és munkatársai eredményei alapján (1999) a rendszeres reszelőnyelv kitürése,

mely a felnőtt szerű táplálkozás egyik ismertető jele, E90%-os stádiumú embrióktól kezdve figyelhető meg. Kísérleteinkhez az embriókat véletlenszerűen eltávolítottuk a petezsákból és Balaton-vízzel teli Petri-csészékbe helyeztük. Az egész kísérletsorozat során az embriók radula aktivitását sztereomikroszkóphoz kapcsolt videokamerával (MyScope 130M, Webbers, USA) rögzítettük. Az állatokat szobahőmérsékleten tíz percig nyugalomban hagytuk, hogy hozzászokjanak a normál fényhez, majd további 10 percig videofelvételt készítettünk róluk. A 10 perces intervallumból 3 x 1 percig számoltuk reszelőnyelv kitűrését, és ennek az átlaga adta az egy perc alatt bekövetkező radula kitűrések számát, ami kontrollként szolgált. Ezután a Balaton-vízhez hozzáadtuk a különböző farmakonokat, majd 15, 45, illetve esetenként 90 és 330 perc elteltével 10 percen át videofelvételt készítettünk. Minden kezelés esetében a kísérlet eredménye legalább két különböző petezsákból származó 15 embrió táplálkozási aktivitásából adódik. A kezelések során kapott értékeket a kontroll csoport értékeivel hasonlítottuk össze. Az 5-HT és a különböző 5-HTerg farmakonok hatását a reszelőnyelv (radula) ritmikus kiöltésére kétutas ANOVA Tukey post-hoc teszttel elemeztük.

<b>5-HTP</b>	5-HT szintézis prekurzora
<b>Clomipramin</b>	5-HT újra-felvételi blokkoló
<b>pCPA</b>	5-HT szintézis gátló
<b>5-CT</b>	5-HT <sub>1,5,7</sub> receptor agonista
<b>8-OHDPAT</b>	5-HT <sub>1,7</sub> receptor agonista
<b>Indorenat</b>	5-HT <sub>1,2</sub> receptor agonista
<b>Metergolin</b>	5-HT <sub>1</sub> receptor antagonist, 5-HT <sub>6,7</sub> receptor agonista
<b>S-WAY100135</b>	5-HT <sub>1</sub> receptor antagonist
<b>SB269970</b>	5-HT <sub>7,5,1</sub> receptor antagonist
<b>SB258585</b>	5-HT <sub>6</sub> receptor antagonist

**2. táblázat: A fiziológiai-farmakológiai kísérletekhez felhasznált farmakonok.**

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. Az 5-HTerg innerváció kémiai-neuroanatómiája és ultrastruktúrája *Lymnaea* pofaizomzatában

#### 5.1.1. Az 5-HT-immunreaktív innerváció szerveződése az embrionális és a juvenilis csigák pofaizomzatában

Konfokális mikroszkópos vizsgálataink során E60%-os fejlettségű, közvetlenül a metamorfózis után álló embriók pofaizomzatában nem tudtunk 5-HT immunreaktivitást kimutatni (10A, B, C ábra). Ugyanakkor a fejlődő KIR ganglionjaiban 5-HT immunpozitív elemek már azonosíthatóak voltak. Három 5-HT-IR sejt a cerebrális ganglionban és három jelölt sejt a pedális ganglionban volt látható (10A ábra). A kis átmérőjű (15-20  $\mu$ m) unipoláris 5-HT-IR neuronok axon nyúlványait a fejlődő idegdúcokon keresztül a kialakulóban lévő cerebrális kommisszúrába és a cerebro-pedális konnektívumokba küldték, ezért is voltak könnyen azonosíthatóak (10A, B ábra).

Két nappal később, E80%-os posztmetamorfotikus embriókban konfokális mikroszkóppal megállapítható volt, hogy az első vékony, szórványosan elhelyezkedő 5-HT-IR axon nyúlványok a pofaizomzat felszínén jelennek meg (11A, B ábra). Ettől a stádiumtól kezdve a pofaizomzat 5-HT innervációja viszonylag gyors fejlődésen megy keresztül. Hasonlóan a konfokális mikroszkópos eredményeinkhez, kriosztátos metszeteken is jól látható volt, hogy a pofaizomzatot szegényes és elszórtan előforduló felszíni 5-HT-IR innerváció jellemezte (11C, D ábra). Ugyanakkor az 5-HT-IR nyúlványok gazdagon innerválták a KIR-t, illetve más perifériás elemeket, mint például a talpat és testfalat. A cerebrális ganglionból egy vastag és egy vékony 5-HT-IR köteg futott a pofagangliont összekötő cerebro-bukkális konnektívumba és a pedális gangliont összekötő cerebro-pedális konnektívumban is 5-HT immunreaktivitás volt látható. A fejlődő pofaganglionok körül néhány vékony 5-HT-IR nyúlvány futott, mely a pofaizomzat felszínére is küldött 5-HT-IR axon nyúlványokat.

Konfokális mikroszkópos felvételek szerint egy nappal a peteburokból való kikelést megelőzően, E90%-os embrionális fejlettségű csigák pofaizomzatában további 5-HT-IR axon nyúlványok jelentek meg (12A, B, C ábra). A kriosztátos metszetekben megállapítható volt, hogy a pofaizomzatot innerváló mélységi 5-HT-IR axonok megjelentek, de egészében az 5-HT-



IR innerváció az embriogenezis e késői szakaszában is fejletlen volt (12D ábra). Nagyobb nagyításon már jól kivehetőek voltak az izomsejtek mentén elhelyezkedő axon varikozitások is (12C ábra). A körkörös és hosszanti irányba párhuzamosan futó izomkötegek már a pofaizomzat végleges elrendeződésére utaltak. A pofaganglionok régiójában is növekvő axonarborizáció volt látható. A KIR és más perifériás elemek (talp, testfal) gazdag 5-HT-IR innervációja továbbra is jellemző volt.

E100%-os embrionális fejlettségnél a pofaganglionon áthaladó jelölt axonkötegek száma tovább nőtt és sűrű 5-HT-IR axon hálózat formálódott a pofaizomzat körül is. Teljes preparátumokban jól látható volt, hogy a korábbi vékony 5-HT-IR axon nyúlványok helyett vastagabb és párhuzamosan futó kötegek jelentek meg (13A, B, C ábra). Kriosztátos metszeteken ezek az 5-HT immunpozitív elemek főleg a pofaizomzat külső rétegét innerválták. Az 5-HT-IR innerváció fejlődésével párhuzamosan maga a pofaizomzat is jelentős méretbeli növekedésen ment keresztül. A phalloidin immunfestés már fejlett és összetett pofaizomzatot tárt fel, amiben az izomkötegek egymással párhuzamosan, rendezetten futottak.

A peteburokból kikelő csigákban a pofaizomzat és 5-HT innervációjának sűrűsége drámaian megnövekedett (14. ábra). A méretében megnövekedett pofaizomzatban számos, vékony varikózus elágazódással egy rendkívül sűrű 5-HT-IR hálózat alakult ki. Ebben a stádiumban az 5-HT-IR axonkötegek a pofaizomzat felszíni rétegei mellett már az izomzat mélyebb régióit is sűrűn behálózták.

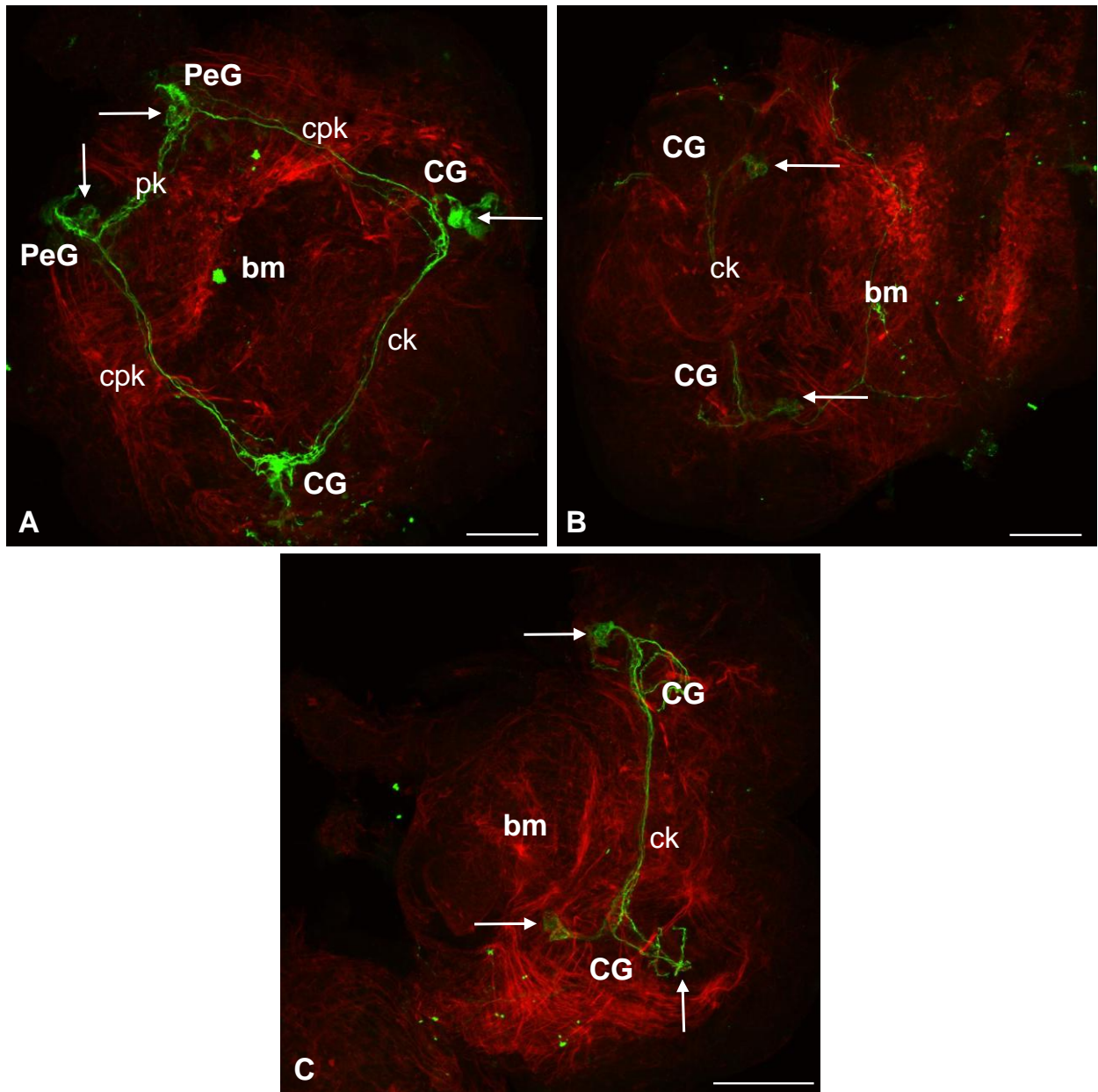
Annak érdekében, hogy megállapítsuk, történik-e további markáns változás az 5-HT-IR innervációban az embriogenezist követő korai, fiatal posztembrionális fejlettségű (P1) és középstádiumú posztembrionális (P3) csigák pofaizomzatában is vizsgáltuk az 5-HT-IR innerváció szerveződését. Ezt a két fejlettségi stádiumot azért választottuk, mert a P1-es stádiumú csigák mutatnak elsőként „free-living”, azaz szabadon mozgó és táplálék szerző magatartás formát, míg a P3-as stádiumú csigák már egy lényegesen fejlettebb, a felnőtt egyedekhez közelítő állapotot képviselnek. Megállapítható volt, hogy a korai P1-es (15A, B ábra), illetve a középstádiumú P3-as (15C, D ábra) juvenilis csigák pofaizomzatának 5-HT-IR innervációs mintázata nagyon hasonló, ugyanakkor a korábbi, kikelő csigákhoz képest lényegesen gazdagabb 5-HT-IR axonrendszert hoznak létre a pofaizomzatban. Intenzív immunreaktivitást mutató varikózus elágazódások sűrűn előfordultak a pofaizomzat mélyebb rétegeiben is. Az 5-HT-IR idegelemek vagy párhuzamosan az izomkötegek felszíne mentén futottak, vagy azt keresztezve és sűrűn behálózva vékony varikózus elágazódásokat küldtek a

mélyebb izomkötegek rétegeibe. A korai posztembrionális stádiumban lévő csigák pofaizomzatában az 5-HT-IR idegelemek sűrűsége a KIR-i és más perifériás régiók (testfal) 5-HT-IR innervációjához képest alacsonyabb volt (15B ábra). A P3-as stádiumú csigák pofaizomzata további méretbeli növekedésen ment keresztül, melyben az izomkötegek fejlett, szimmetrikus elrendeződést mutattak (15D ábra). A P3-as csigák pofaizomzatában az 5-HT-IR innerváció még kifejezettebbé és sűrűbbé vált és hasonlított a KIR-i és más perifériás régiókban megfigyeltekhez. A vastag izomkötegek között húzódó vékony 5-HT-IR axonok sűrű hálózatot alakítottak ki és számos varikozitással rendelkeztek.

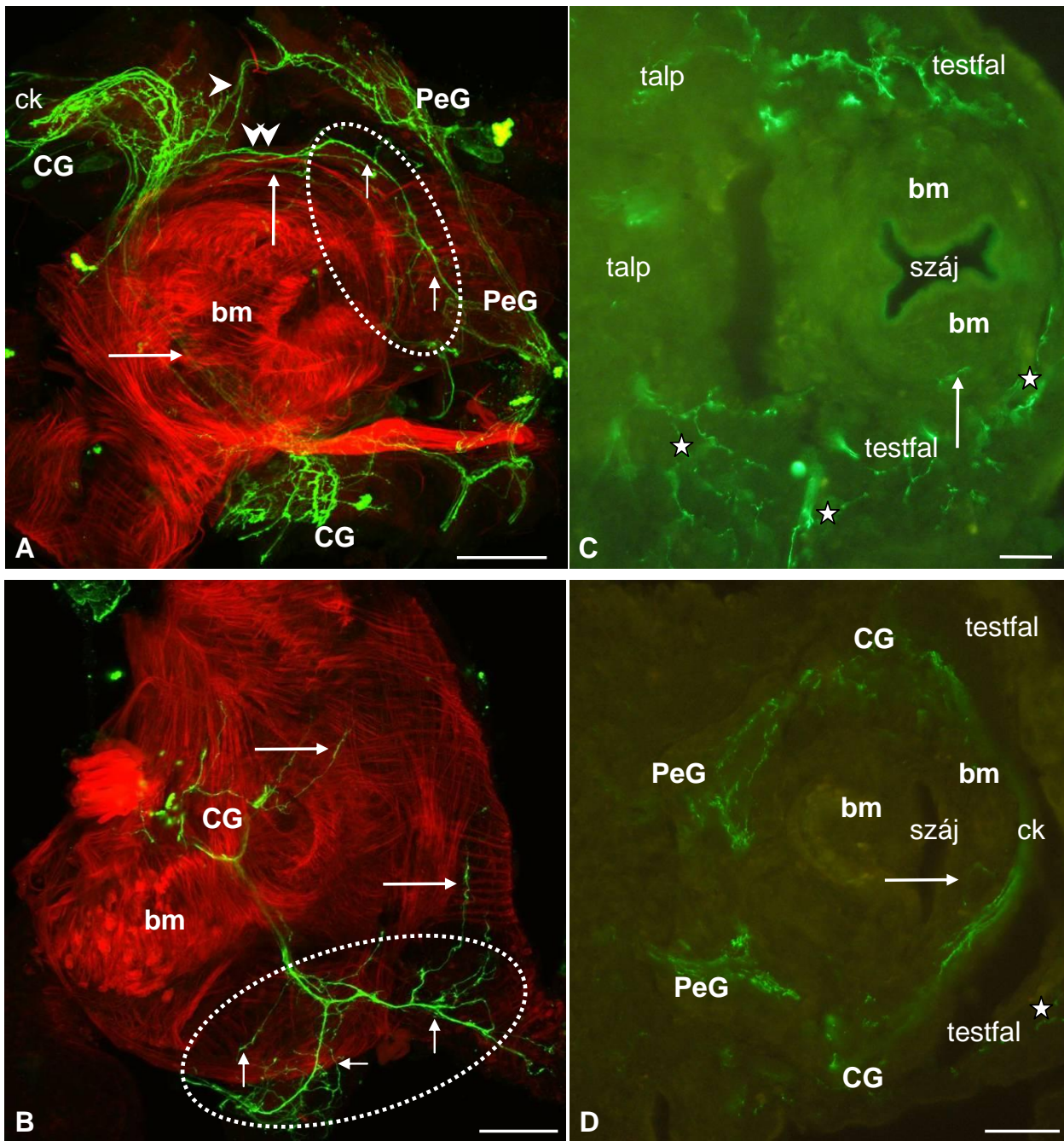
### **5.1.2. Az 5-HT-immunreaktív innerváció szerveződése a felnőtt pofaizomzatban**

Immunhisztokémiai vizsgálatainkat kifejlett csigák pofaizomzatára is kiterjesztettük, hogy teljes képet kapjunk az 5-HT-IR innerváció ontogenetikus szerveződéséről. A felnőtt csigák pofaizomzatában az 5-HT-IR innerváció mintázata a posztembrionális fejlettségi állapothoz képest már nem mutatott lényegi változást (16. ábra); gazdag 5-HT-IR beidegzés volt megfigyelhető. A P3-as juvenilis stádiumot követően az 5-HT-IR innerváció jellege nem, csak az izom további növekedésének megfelelően sűrűsége változott.

Az 5-HT-IR kötegek először kisebb axon ágakra vagy egyéni axon nyúlványokra oszlottak szét, melyek vékony varikózus elemekkel végződtek az egyes izomsejteken, kapcsolatot létesítve azokkal. Ezek a vékony varikózus nyúlványok gazdagon elágazódva vagy az izomkötegek mentén hosszan futottak vagy az izomkötegen „pókháló-szerűen” végződtek. Mind a hosszanti, mind a körkörös izomzat hasonló 5-HT-IR innervációs mintázatot mutatott a kifejlett csigák pofaizomzatában is. A kriosztát metszetekben jól látszódott a felnőtt pofaizomzat sűrű, gazdagon arborizáló mélységi 5-HT-IR innervációja (16A-D ábra). A kriosztát metszetekhez hasonlóan, az 50 µm-es rezgőkéses szeletekben a kétlépéses peroxidáz módszer alkalmazását követően is rendkívül sűrű és összetett, egyszerre több izomköteget is beidegző 5-HT-IR axonnyúlványok rendszerét találtunk (17E, F ábra)

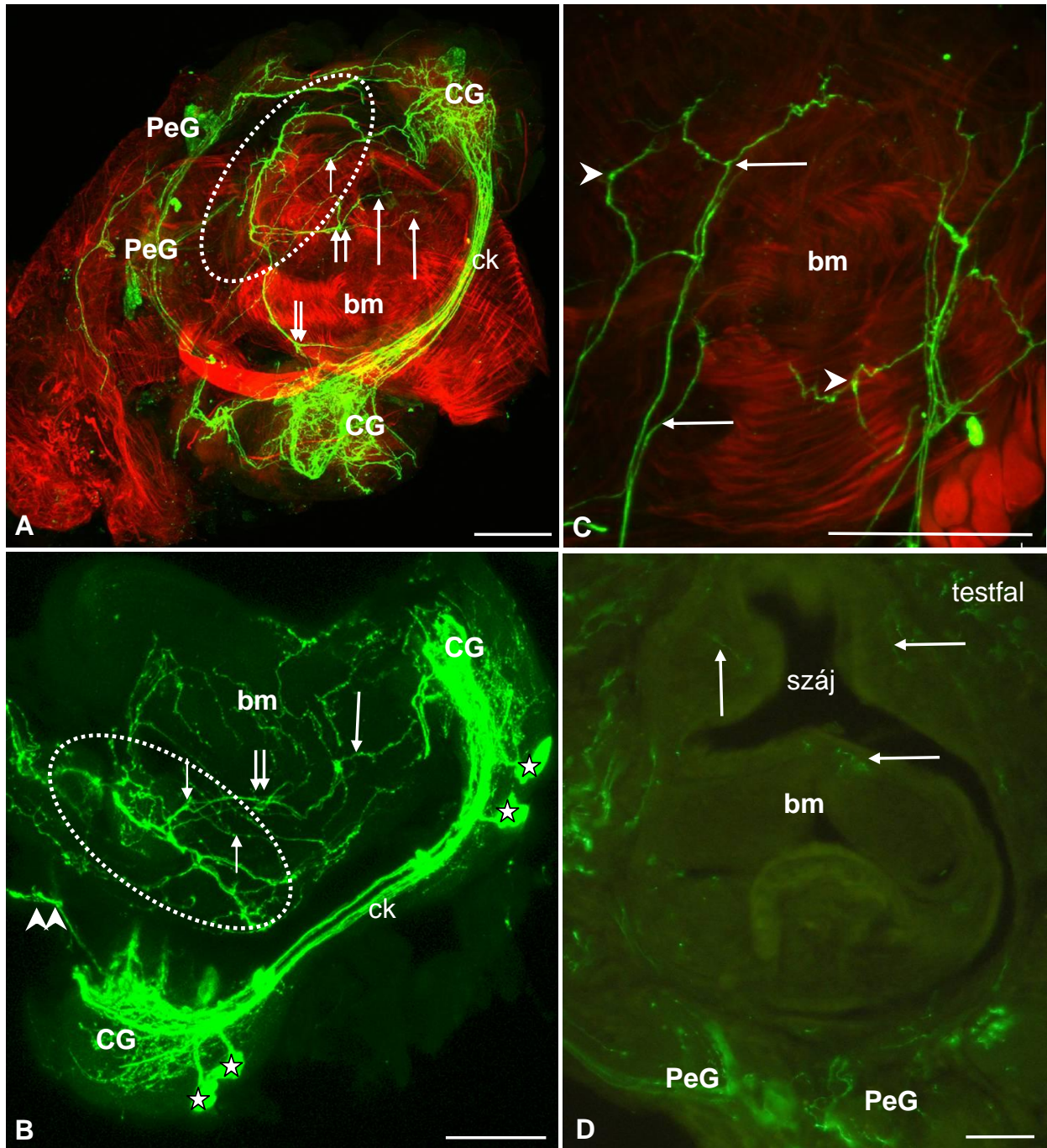


**10. ábra: A pofaizomzat és a KIR képe az E60%-os fejlettségű embriókban.** A pofaizomzat (bm, piros fluoreszencia) 5-HT-IR idegelemektől mentes, míg a cerebrális (CG) és a pedális (PeG) ganglionokban már megjelent az 5-HT-IR innerváció (zöld jelölés). A jelölt idegsejtekből (nyilak) 5-HT-IR rostok futnak a cerebrális (ck), a pedális (pk) kommisszurákban és a cerebro-pedális (cpk) konnektívumban. Teljes preparátum, konfokális mikroszkópia, horizontális nézet. Aránymértékek: 50  $\mu$ m



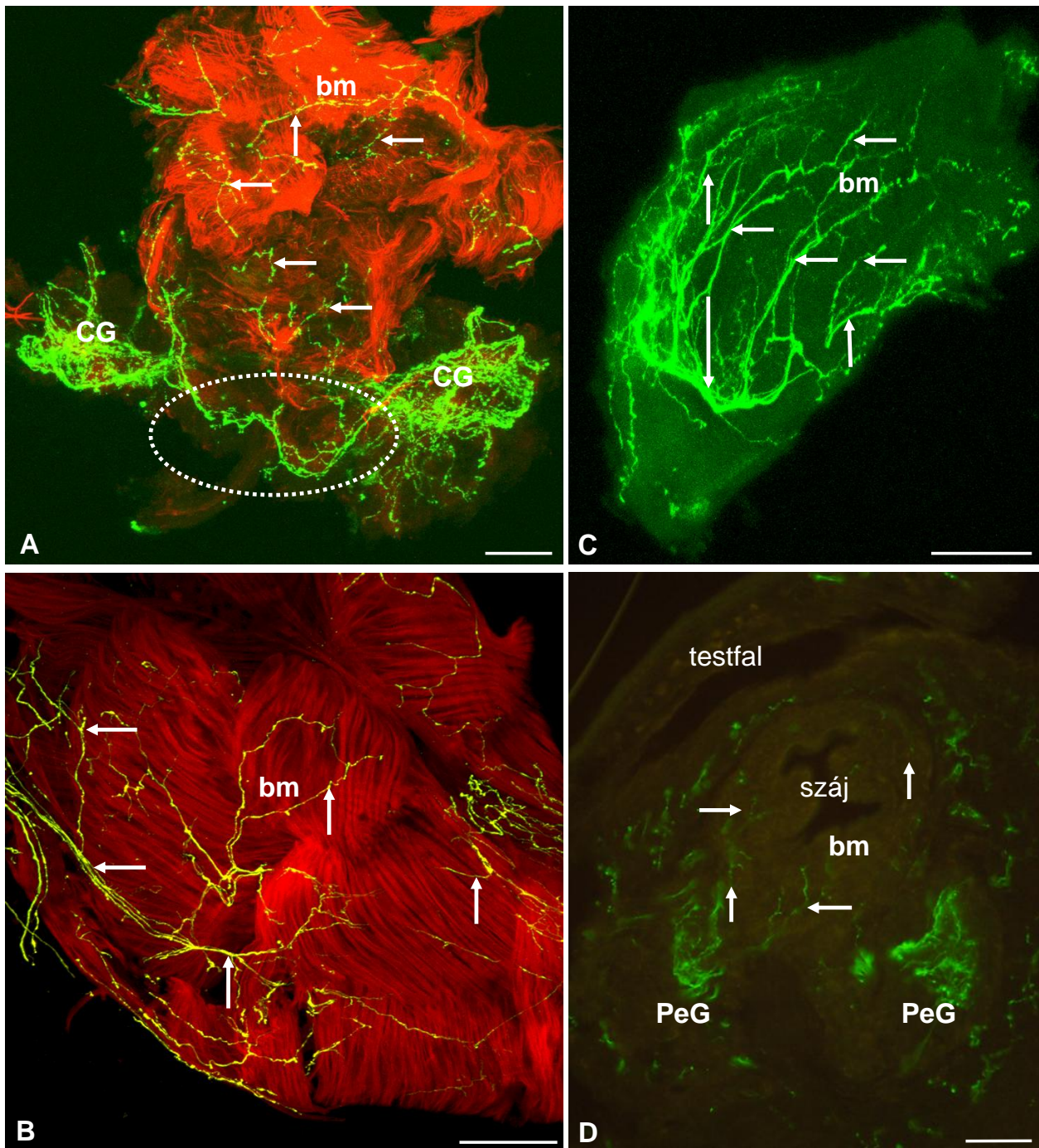
**11. ábra: 5-HT-IR idegelemek E80%-os fejlettségű embriók pofaizomzatában (bm) konfokális mikroszkópban (A, B) illetve kriosztát metszetekben (C, D):** Az első vékony 5-HT-IR axonnyúlványok (hosszú nyilak) a pofaizomzat felszínén jelennek meg, miközben a cerebrális (CG), és a pedális (PeG) ganglion, valamint a talp és a testfal is gazdagon innervált (csillagok). A szaggatott vonalú kör a fejlődő pofaganglionokat, a kettős nyílhegyek a cerebro-bukkális konnektívumot jelölik. A pofaganglionokba belépő, majd elágazó jelölt axonrendszer (rövid nyilak) a CGC-ből indulnak. Teljes preparátum, konfokális mikroszkópia, horizontális (A, C, D) és szagittális (B) nézet. CG – cerebrális, PeG – pedális ganglion, ck – cerebrális kommisszura. Aránymértékek: 50  $\mu$ m.





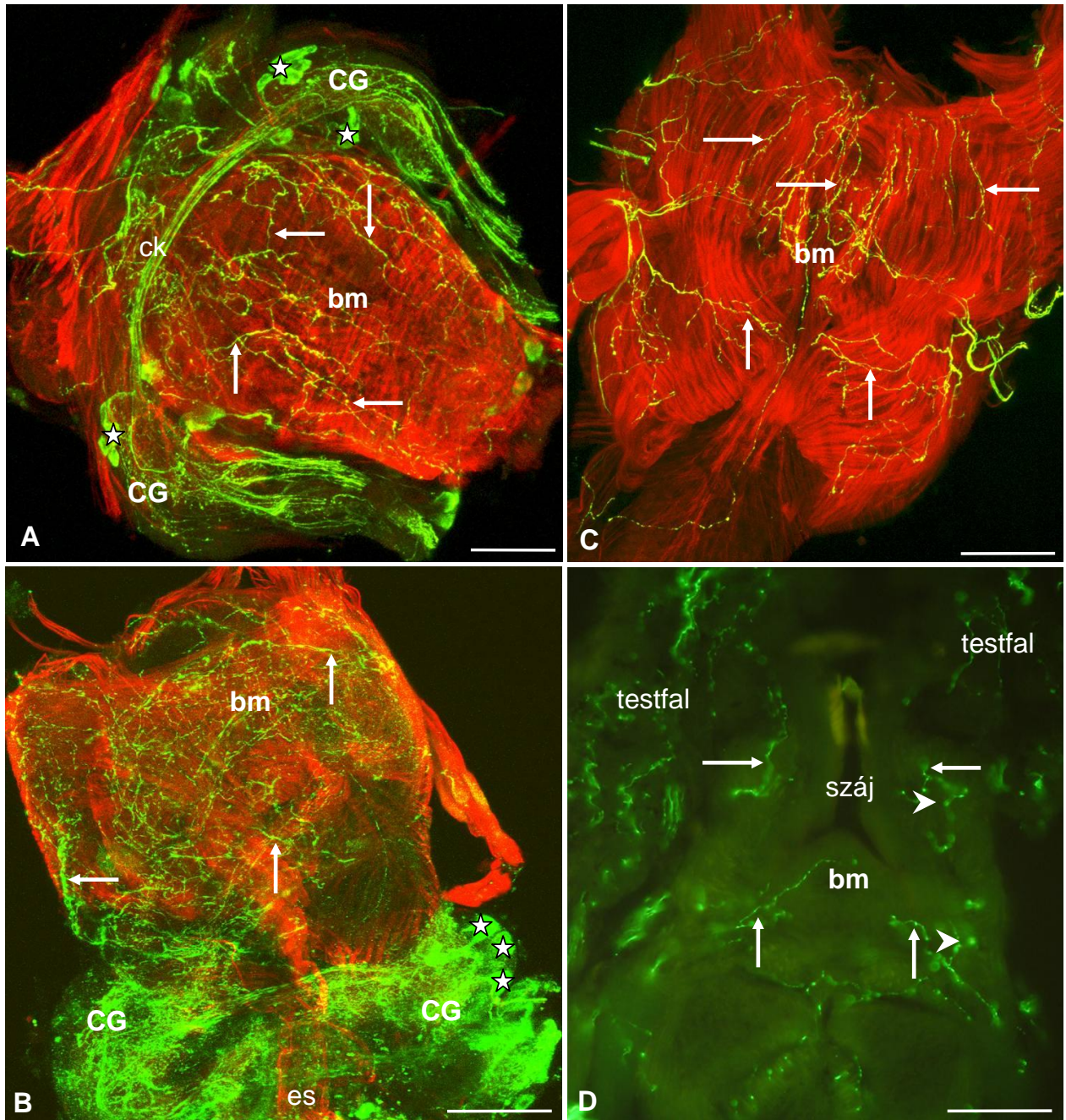
**12. ábra: 5-HT-IR idegelemek E90%-os fejlettségű embriók pofaizomzatában (bm) konfokális mikroszkópban (A, B, C) illetve kriosztát metszetben (D):** Az embrió pofarégiójában a száj körüli pofaizomzatot a felszíni innerváció mellett szegényes mélységi 5-HT-IR innerváció (hosszú nyíl) jellemzi. A szaggatott vonalú kör a pofaganglionok régióját jelöli, melyben már több jelölt axonprofil (rövid, vékony nyilak) figyelhető meg. A kettős nyilak az 5-HT-IR rostok első elágazásait mutatják. A pofaizomzat nagyobb nagyításán (C) az izomzat mentén a jelölt axonokon kívül (hosszú nyíl) varikozitások (nyílhegy) is megfigyelhetők már. Kettős nyílhegy – cerebrális ideg, CG – cerebrális, PeG – pedális ganglion, ck – cerebrális komisszura, csillag – idegsejt. **A, B, C, D:** Horizontális nézet. Aránymértékek: 50  $\mu$ m.





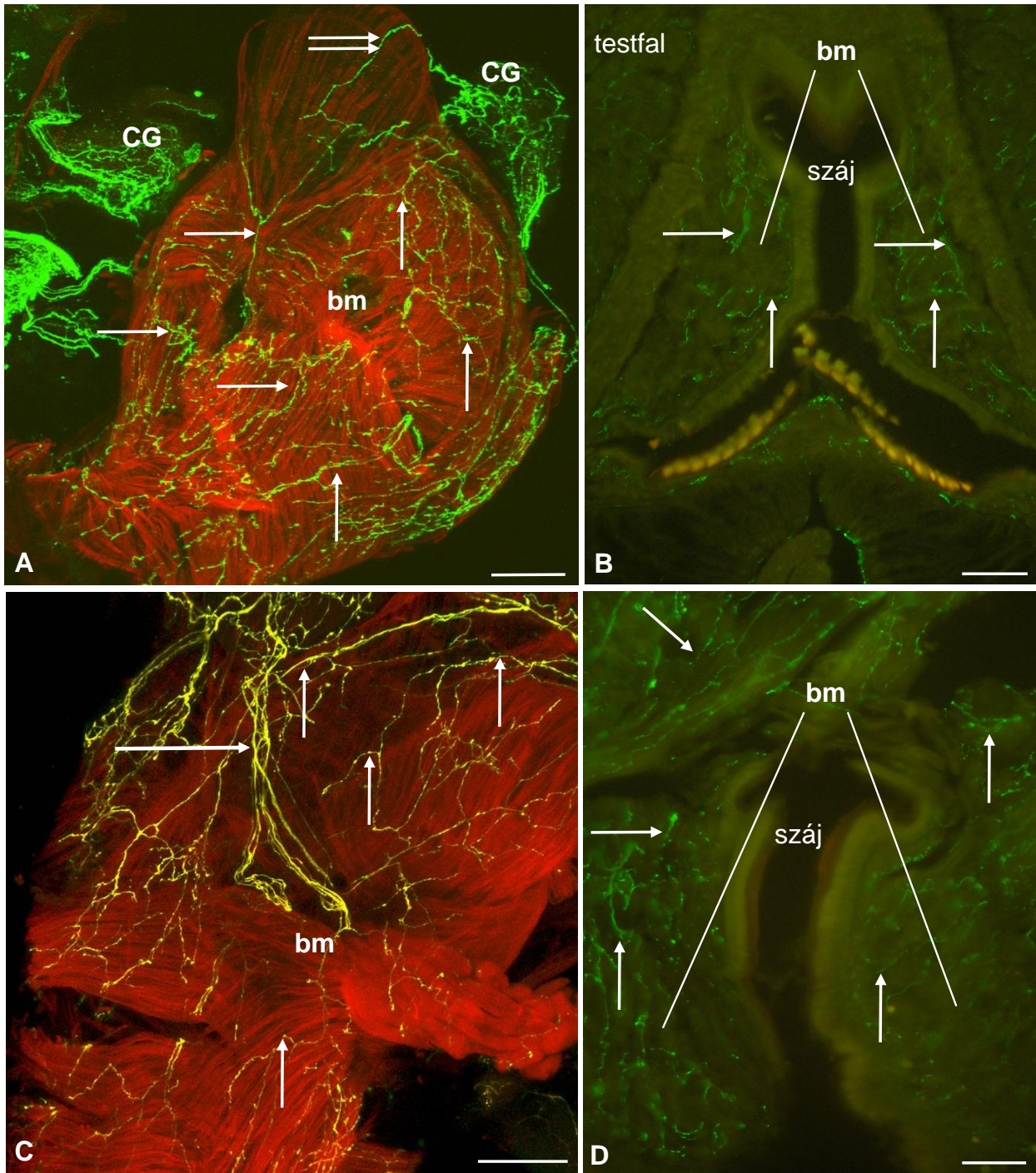
**13. ábra: 5-HT-IR idegelemek E100%-os fejlettségű embriók pofaizomzatában (bm).** A: Az 5-HT-IR axonok (nyilak) sűrű varikózus hálózatot alakítanak ki a pofaizomzatban. A cerebro-bukkális kommisszúrában és a pofaganglionok régiójában (szaggatott vonalú kör) is megnő a jelölt axonok száma. B: Az 5-HT-IR idegelemek (nyíl) sűrűn beidegzik az izomkötegekben párhuzamosan futó izomrostokat. A phalloidin festődés már igen fejlett pofaizomzatra utal. C: A fő 5-HT-IR axon (hosszú nyíl) a pofaizomzatban gazdagon elágazik. A, B, C: Teljes preparátum, konfokális mikroszkópia, horizontális (A) és szaggitális (B, C) nézet. D: Kriosztat metszetben is jól látszik, hogy az 5-HT-IR nyúlványok sűrűn beidegzik a pofaizomzat mélyebb rétegeit is. Horizontális sík. CG – cerebrális ganglion, PeG - pedális ganglion. Aránymértékek: 50  $\mu$ m.





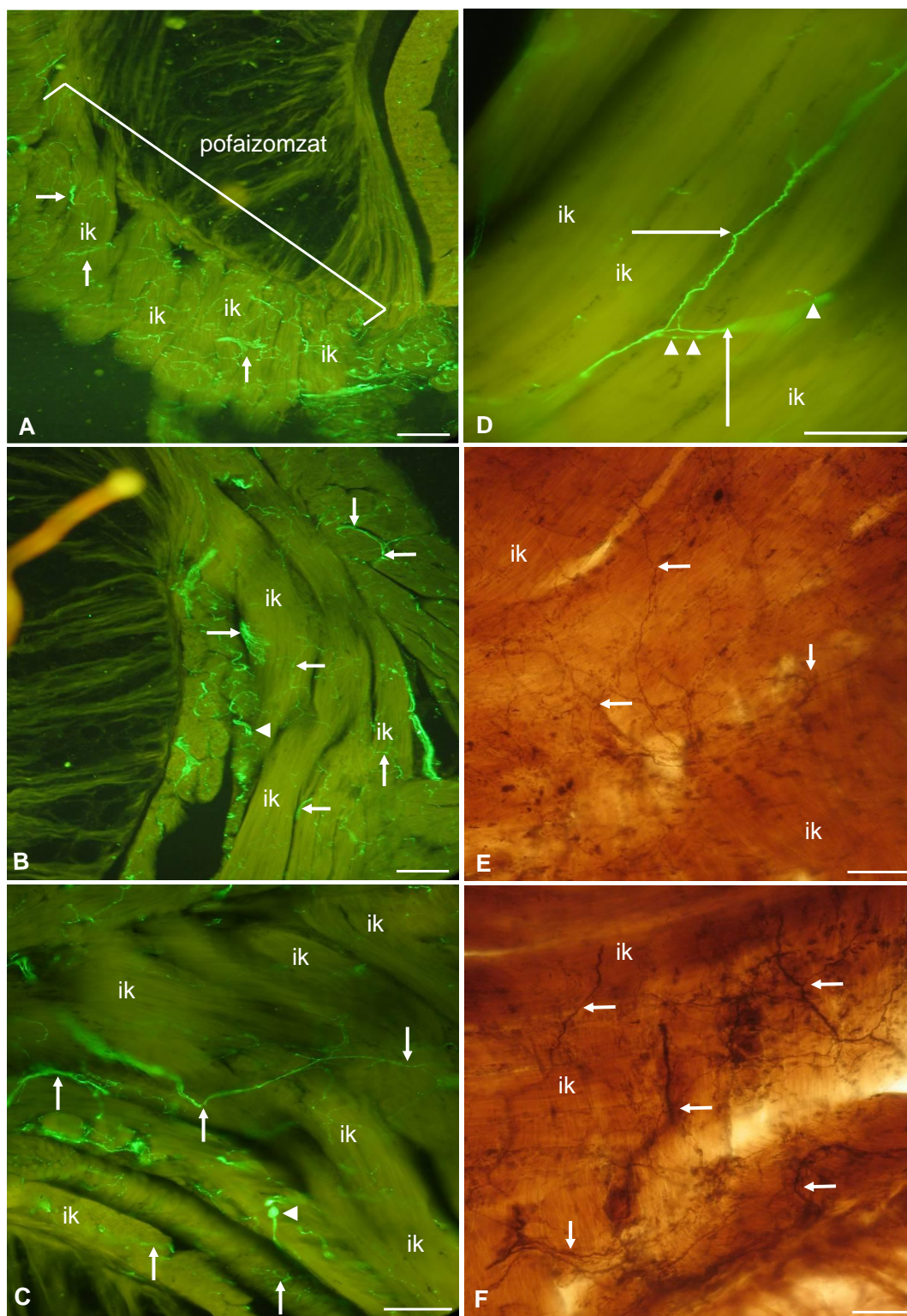
**14. ábra: 5-HT-IR idegelemek a kikelő (hatchling) embriók pofaizomzatában (bm). A-C:** A méretében megnövekedett pofaizomzat 5-HT-IR innervációja a jelölt rostok sűrű hálózataival jellemezhető (nyilak). Teljes preparátum, konfokális mikroszkópia, horizontális nézet. CG – cerebrális ganglion, ck – cerebrális komisszura, csillag – 5-HT-IR idegsejtek, es – nyelőcső. **D:** A fejlett 5-HT-IR innerváció látható a száj körüli pofaizomzat horizontális kriosztát metszetében is, ahol már varikózítások is jól megfigyelhetők (nyílhegy). A testfal szintén sűrű 5-HT-IR innervációval rendelkezik. Aránymértékek: 50  $\mu$ m.





**15. ábra: 5-HT-IR idegelemek a posztembrionális (P1, P3) csigák pofaizomzatában (bm).** **A, B:** Korai (P1) posztembrionális stádiumú csigák pofarégiójának kettős festése sűrű 5-HT innervációra (zöld) és fejlett, jól szerveződött pofaizomzatra (piros) utal. A pofaizomzat 5-HT-IR innervációjának (nyíl) mélységi mintázata lényegesen sűrűbb elrendeződést mutat, mint az embrionális stádiumokban. Jól látható a cerebrális ganglionból (CG) kiinduló 5-HT-IR axon (kettős nyíl). **C, D:** Idősebb (P3) juvenilis csigák pofarégióját is igen gazdag 5-HT-IR innerváció (rövid nyíl) jellemzi. A pofaganglion felől belépő fő 5-HT-IR axon köteget a hosszú nyíl mutatja. **A, C:** Teljes preparátum, konfokális mikroszkópia, szaggitális nézet. **B, D:** Kriosztát metszet, horizontális nézet. Aránymértékek: 50μm.





**16. ábra: 5-HT-IR idegelemek a felnőtt *Lymnaea* pofaizomzatában.** **A:** Az 5-HT-IR axonok (nyíl) gazdagon arborizálnak és sűrűn behálózzák az izomkötegeket (ik). **B, C:** A varikózus (nyílhegy) axon nyúlványok (nyíl) néha egyszerre több izomköteget (ik) is innerválnak. **D:** 5-HT-IR varikózus axonnyúlványok (nyílhegy) nagyobb nagyítása. Jól megfigyelhető, hogy az egyik axonág (hosszú nyíl) két izomköteg között, míg a másik (hosszú nyíl) az izomköteg felett halad át. Horizontális kriosztát metszetek. **E, F:** Az 5-HT-IR innerváció kétlépéses IgG-peroxidáz módszerrel megjelenítve 50 µm-es Vibratome metszetekben kisebb (E) és nagyobb nagyításon (F) is hasonló mintázatot mutat, mint a fluoreszcens metszetekben. Aránymértékek: 60 µm.

### 5.1.3. A pofaizomzat és az ideg-izom kapcsolatok általános ultrastruktúrája embrionális és juvenilis korú *Lymnaea*-ban

A pofaizomzat ultrastruktúrális vizsgálatát megelőzően 1  $\mu$ m-es toluidinnal festett félvékony metszeteket készítettünk az E80%-os, E90%-os és E100%-os embriók, valamint korai juvenilis (P1) posztembrionális *Lymnaea* pofarégiójából a pontosabb orientáció és a pofaizomzat szerkezeti felépítésének áttekintő megismerése érdekében (17A-D ábra).

A félvékony metszetek elemzése alapján is megállapítható volt, hogy az izomelemek a fejlődés során viszonylag későn jelentek meg. A késői embrionális stádium ellenére az E80%-os embriók pofaizomzata még viszonylag fejletlen volt, a nyelőcső körül körkörös, vékony rétegben futó izomkötegeket azonban már jól el lehetett különíteni a testfalat felépítő izomkötegektől (17A ábra). Kiterjedésük nem volt jelentős, azok csak szorosan a nyelőcső körül koncentráálódtak. A pofaizomzat szerkezetében a fejletlen izomzat mellett könnyen felismerhetőek voltak a táplálékfogyasztáshoz kapcsolódó szájszerv, a radulazsákban helyet foglaló reszelőnyelv (radula) éles fogai is (17A ábra, beillesztett kép).

E90%-os embrióban a vékony rétegű pofaizomzat szerkezete megváltozott; egy vastag és többrétegű kiterjedtebb bukkális izomzat alakult ki a nyelőcső körül (17B ábra). A pofaizomzat a testfaltól, illetve a nyelőcsövet burkoló hámrétegtől is jól elkülöníthető volt. Ez a bukkális massa láthatóan már készen áll a tojáson kívüli juvenilis élethez kapcsolódó, aktív táplálkozás megvalósítására.

Közvetlenül a tojás elhagyása előtt, az E100%-os fejlettségű embrió pofaizomzatának mérete tovább nőtt (17C ábra) az előző két vizsgált embrionális stádiumhoz képest. Erre az időszakra már egy szerkezetében magas fokon differenciált, több rétegben jelen levő és párhuzamosan futó, körkörös és hosszanti izomzat alakult ki.

A korai juvenilis, P1-es stádiumú *Lymnaea* pofaizomzatának szerkezete jelentős mértékben hasonlított az E100%-os embrióban megfigyeltekhez (17D ábra), azonban méretében tovább növekedett.

A félvékony metszetek elemzését követően vizsgáltuk a pofaizomzat és az ideg-izom kapcsolatok általános ultrastruktúrális szerkezetét, melynek során először az E80%-os stádiumú embriók pofaizomzatát (18A ábra) és az abban előforduló ideg-izom kapcsolatok finomszerkezetét elemeztük (18D ábra). A pofaizomzat ebben az embrionális korban még

viszonylag fejletlen volt, kevés kontraktilis filamentumot tartalmazott, az izomelemek többsége magányos formában volt jelen, bár egyes esetekben már kisebb kötegekbe is rendeződtek (18A ábra). Ebben a stádiumban szembetűnő volt az izomsejtek szarkoplazmájában a szabad riboszómák nagy mennyisége, valamint a fehérje szintetizáló apparátus, a szemcsés endoplazmás retikulum egységeinek a jelenléte (18D ábra). E80%-os fejlettségű *Lymnaea* embriók pofaizomzatában, csakúgy, mint a későbbi (E90%, E100% és juvenilis) stádiumokban is, a megjelenő ideg-izom kapcsolatoknál az izom és axonok membránjai szorosan (16-20 nm) és hosszan összekapcsolódtak, azonban membránspecializációt sosem lehetett megfigyelni. Az axonprofilok és varikozítások vagy az izomrost mentén (felszínén), vagy az izomrostok között, azokba mélyen beágyazva fordultak elő (18D ábra). Az axonkötegek szorosan elhelyezkedő, főleg neurotubulosokat tartalmazó, különböző méretű axonprofilokból álltak, egyes esetekben vezikulákat és granulumokat is tartalmaztak. A varikozítások többségben nagyméretű (80-100 nm) granuláris és/vagy kis (50-60 nm) agranuláris vezikulák fordultak elő.

E90%-os stádiumú embriók pofaizomzatának fiomszerkezete már összetettebb volt. A kontraktilis elemek száma megnőtt, szerveződésük egyre rendezettebbé vált. A kontraktilis elemek már fejlett miofibrilláris szerkezetet mutattak: az izomrostokat nagyszámú, tömött, párhuzamos lefutású miofibrillum töltötte ki. Az izomrostok rendezett és fejlett miofibrilláris szerkezete mind hossz-, mind kereszt- és harántmetszetben is egyaránt feltárult. Axon profilok és varikozítások izomrostok mentén voltak fellelhetők. Ezek a profilok vagy szoros (16-20 nm távolságú) membrán kapcsolatokat alakítottak ki az izomsejtekkel, vagy az izomrosttól távolabb helyezkedtek el. Egyes esetekben hosszan és szorosan összefekvő szarkolemmát és axolemmát lehetett látni, aszimmetrikus elhelyezkedésű preszinaptikus vezikula felhalmozódással.

Az E100%-os embriók vastag hámréteggel borított garatja és nyelőcsőve körül elhelyezkedő pofaizomzatban az izomrostok már fejlett kontraktilis apparátussal rendelkeztek (18C ábra). A pofaizomzat innervációjának ultrastrukturális tanulmányozásakor az előforduló idegvégződéseket vezikula/granulum tartalom alapján csoportosítottuk. Többségében olyan axonprofilokat találtunk, melyekben a granuláris és az agranuláris vezikulák együttesen fordultak elő (18E ábra).

A posztembrionális stádiumú *Lymnaea*-k pofaizomzatának finomszerkezete lényegében hasonlított a késői embrionális (E100%-os) stádiumban lévő *Lymnaea* egyedek ultrastrukturális képére. Az izomrostokban tömött, egymással szorosan és párhuzamosan futó kontraktilis elemeket figyeltünk meg. A korai posztembrionális csigák (P1) pofaizomzatában egyes

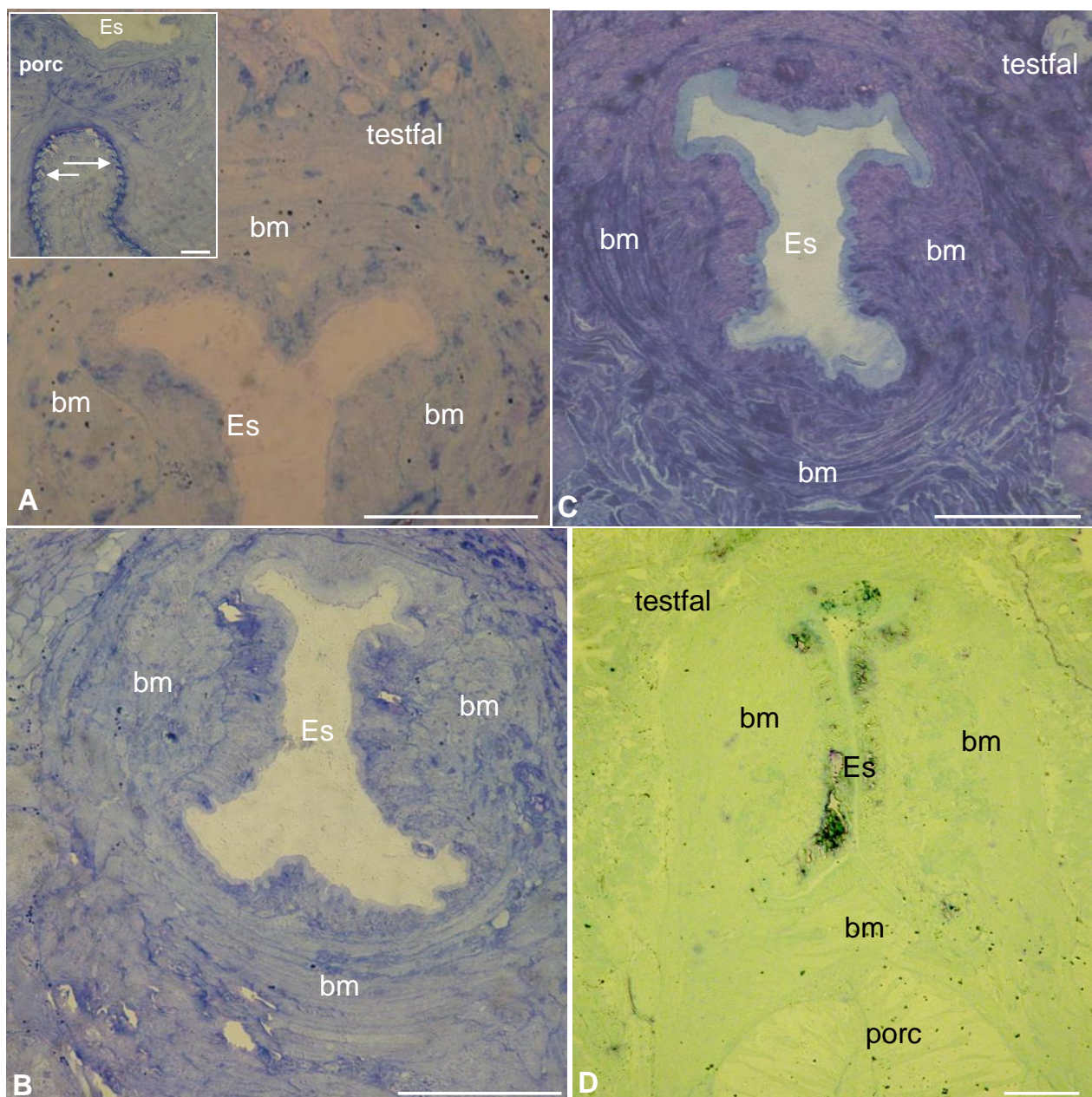
esetekben gyenge, aszimmetrikus preszinaptikus vezikula felhalmozódás mellett interszinaptikus résanyag is megfigyelhető volt (18F ábra). Az axonprofilok már szorosan egymás mellett elhelyezkedve kötegekbe rendeződtek (19A, B ábra). Ezeket az axonkötegeket gliaelemek kísérték, melyek előfordultak a neuromuszkuláris kapcsolatok közvetlen közelében is. Az axonprofilok nagy számban tartalmaztak granuláris vezikulákat a juvenilis stádiumú csigákban is, de az axonkötegekben vezikulamentes idegvégződéseket is megfigyeltünk (19C ábra). Egyedülálló, az izomsejtbe mélyen beágyazott axonprofilok membránspecializáció nélkül hoztak létre ideg-izom kapcsolatokat, melyekben aszimmetrikus vezikulafelhalmozódás volt látható (19D ábra).

#### **5.1.4. Az 5-HT-immunreaktív ideg-izom kapcsolatok ultrastrukturális szerveződése a pofaizomzat maturációja során**

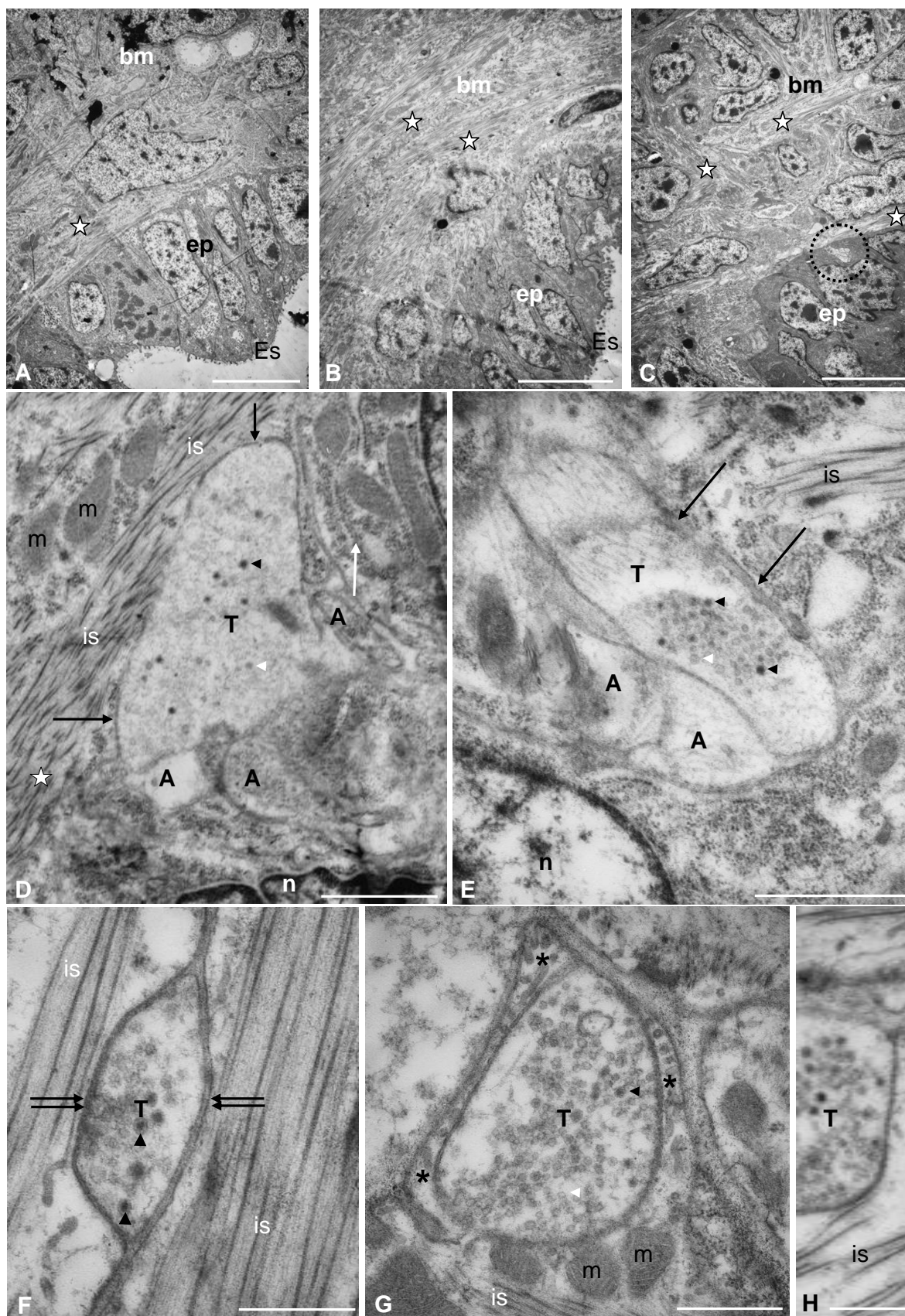
Az ideg-izom kapcsolatok általános ultrastrukturájához hasonlóan az első 5-HT-IR axonok és ideg-izom kapcsolatok is csak az embriogenezis késői szakaszában, E80%-os fejlettségű csigák pofaizomzatában voltak először megfigyelhetők (20A, B ábra). A késői megjelenés ellenére az immunpozitív axonprofilot tartalmazó axonkötegek száma ekkor még alacsony volt. Az 5-HT-IR varikozitások kétféleképpen innerválták a pofaizomzat izomsejtjeit: vagy az izomrostok felszínén végződtek (20A ábra) vagy mélyebben beágyazódtak az izomrostokba illetve azok közé (20B ábra). Mindkét esetben szoros (16-20 nm távolságú) membrán kapcsolatokat alakítottak ki az izomrostokkal, és hasonlóan a rutin elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz membránspecializációra utaló ultrastrukturális jeleket itt sem tudtunk megfigyelni. Ennek azonban az is oka lehetett, hogy az igen erős immunprecipitáció elfedte azokat. A különböző méretű, de főként kis átmérőjű (0.5-1  $\mu\text{m}$ ) axonvarikozitások egyaránt tartalmaztak 50-60 nm-es agranuláris és 80-120 nm-es granuláris vezikulákat is, melyek esetenként aszimmetrikusan felhalmozódtak a „preszinaptikus” membrán mentén.

Az E100%-os fejlettségű embriókban az 5-HT-IR idegelemek száma már jóval több volt, mint az előző stádiumban. A varikozitások ultrastrukturális szerkezete hasonlított a korábbi E80%-os embriókban megfigyeltetekhez (20C, D ábra). Az izomsejtek és az axonprofilok közti membránkapcsolatok specializáció nélküliek voltak, varikozitások rövid axon szakaszokkal kapcsolódtak az izomsejtekhez.



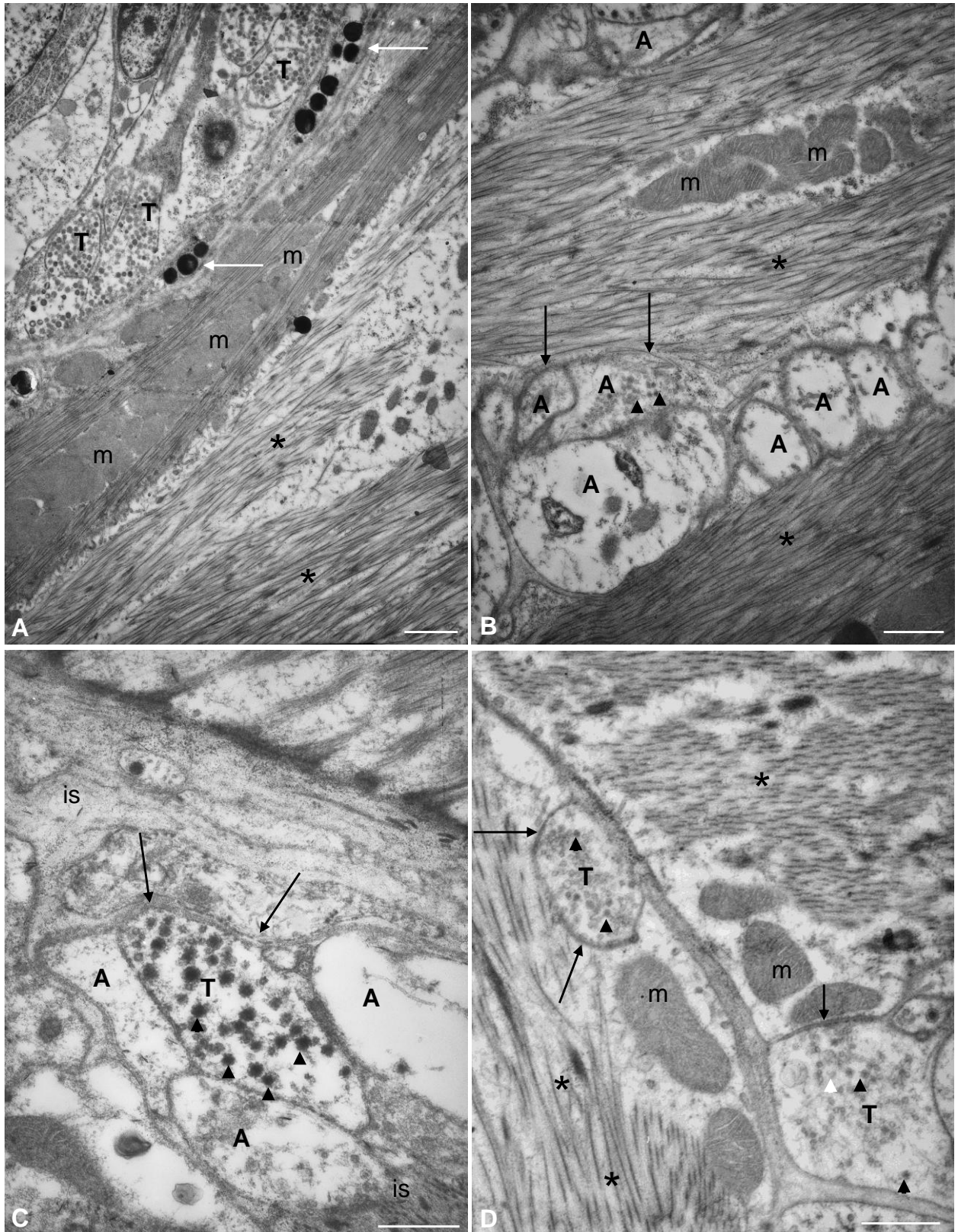


**17. ábra** A késői embrionális és korai posztmebrionális *Lymnaea* pofarégio fénymikroszkópos képe 1  $\mu$ m-es félvékony Araldite metszeteken. **A:** A nyelőcső (Es) körül elhelyezkedő fejletlen pofaizomzat (bm) E80%-os stádiumú embrióban. **Betétkép:** A porcos rész mögött elhelyezkedő éles radula és radula fogak (nyilak). **B:** Az E90%-os fejlettségű embrióban a pofaizomzat szerkezete már többbétegű, fejlettebb képet mutat. **C, D:** E100%-os embrió (**C**) és P1-es juvenilis csiga (**D**) pofaizomzata már kifejlett, vastag, párhuzamosan futó rendezett izomkötegeket tartalmaz. Es- nyelőcső. Aránymértékek: 50  $\mu$ m



18. ábra





19. ábra

**18. ábra: A fejlődő pofaizomzat (bm) és ideg-izom kapcsolatok ultrastruktúrális késői (E80%-E100%) *Lymnaea* embriókban, valamint korai posztembrionális csigákban. A-C: E80%-os (A), E90%-os (B) és E100%-os (C) fejlettségű embrió nyelőcső (Es) körüli pofaizomzatának kis nagyítású elektronmikroszkópos felvételei. Az E80%-os embrió pofaizomzata még kevés kontraktilis filamentumot (csillag) tartalmaz. D-H: Ideg-izom kapcsolatok E80%-os (D), E100%-os (E) valamint P1-es (F, G, H) csigák pofaizomzatában, melyek száma az embriogenezis végére (E100%) egyre növekszik és rendezetté válik. A varikozítások (T) granuláris (fekete nyílhegy) és agranuláris (fehér nyílhegy) vezikulákat egyaránt tartalmaznak, és alkalmanként egynél több izomsejtet (is) is innerválnak (kettős nyílak). A varikozításokat gyakran a szarkoplazma nyúlványok (csillagok) teljesen körbe ölelik (G). Az axon végződés az izomsejtekhez membránspecializáció nélkül (nyíl) kapcsolódnak. A fehér nyíl szemcsés endoplazmás retikulum elemet jelöl. m – mitokondrium, ep – hámréteg. Aránymértékek: A-C: 4 µm, D-H: 0.2 µm.**

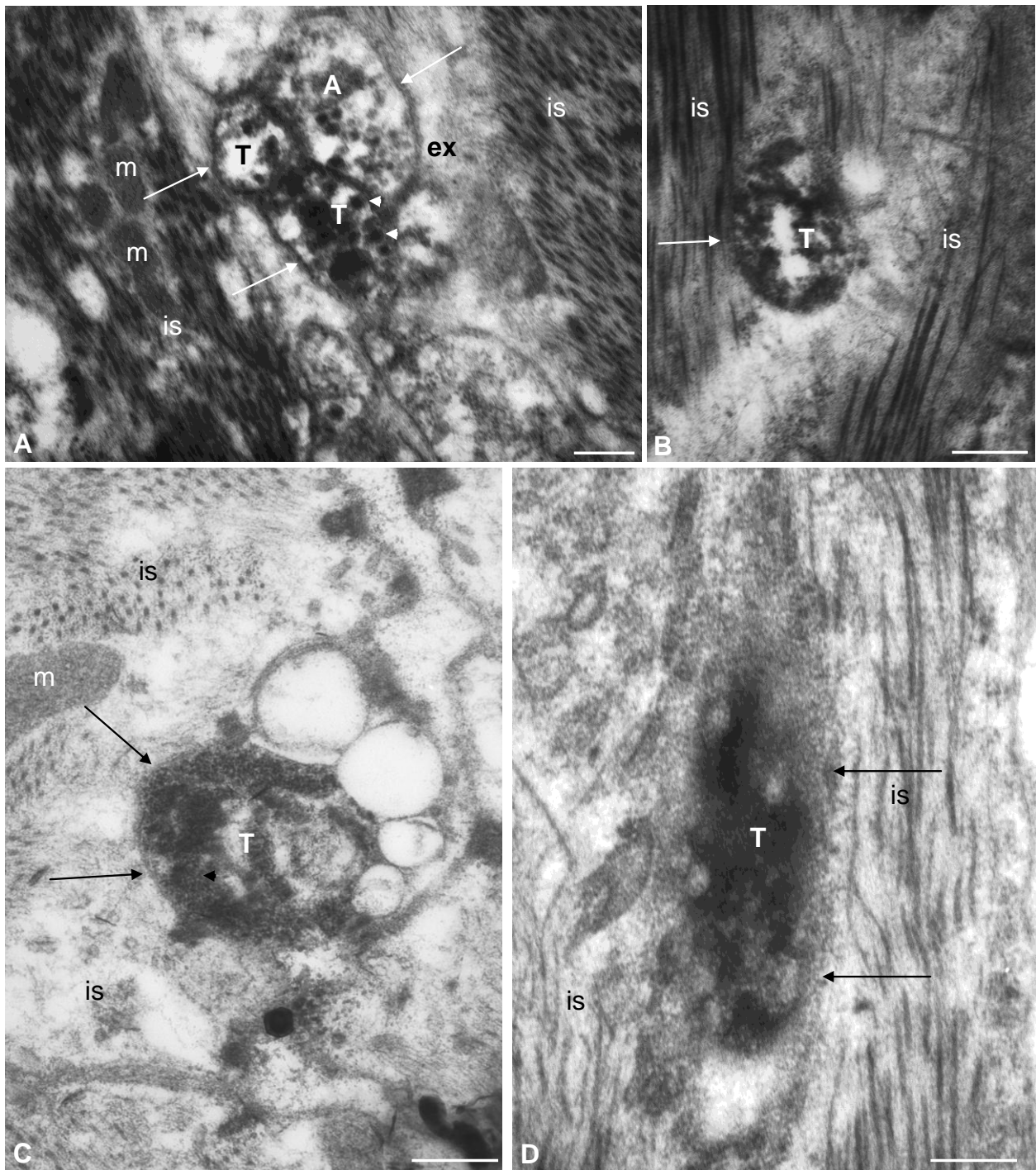
**19. ábra: Ideg-izom kapcsolatok ultrastruktúrális szerkezete korai (P1, P2) posztembrionális csigák pofaizomzatában. A, B: Kötegekbe rendeződött varikozítások (T) és axonprofilok (A) az izomsejtek között a korai (P1) juvenilis csiga pofaizomzatában. C, D: A granuláris (fekete nyílhegyek) és agranuláris (fehér nyílhegyek) vezikulákat tartalmazó varikozítások (T) és axonprofilok (A) specializáció nélküli membránkapcsolatot létesítenek az izomsejtekkel viszonylag hosszú párhuzamosan futó pre- és posztszinaptikus membrán szakaszok mentén (P2 juvenilis stádium). Egyes varikozítások mélyen beágyazottak az izomsejtekbe (D). Fehér nyíl – glia nyúlvány, m – mitokondrium. Aránymértékek: 0.3 µm.**



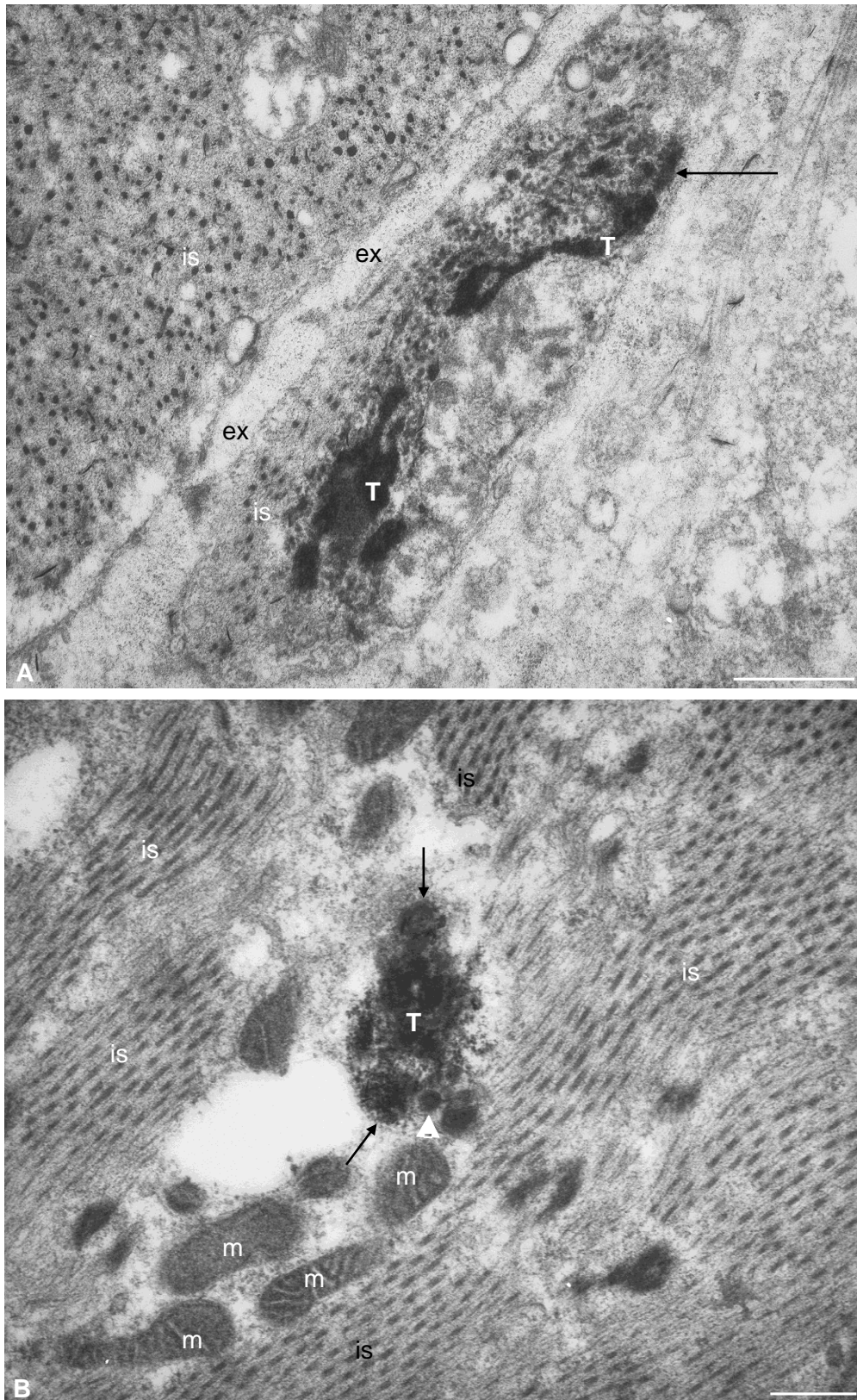
A posztembrionális csigák pofaizomzatában az 5-HT-IR axon nyúlványok száma lényegesen magasabb volt, mint az embrionális stádiumban. Ezek az 5-HT-IR varikozitások egyes esetekben hosszan érintkeztek az izomsejtek membránjával (21A ábra), vagy rövid, szoros kapcsolatot alakítottak ki (21B ábra).

A korrelatív fény- és elektronmikroszkópos immunhisztokémiai vizsgálataink során a felnőtt *Lymnaea*-k pofaizomzatából készített 50  $\mu\text{m}$ -es vibratómos metszeteken jól megfigyelhető volt a pofaizomzat 5-HT-IR innervációjának általános mintázata (22. ábra). A száj, a garat és a nyelőcső körül körkörös elhelyezkedő pofaizomzatot sűrűn innerválták 5-HT-IR axonnyúlványok, melyek először kötegekbe rendeződtek, majd számos elágazódással gazdagon arborizáltak, hálózatot alakítva ki az izomkötegekben. A mélységi izomrétegeket beidegző axonnyúlványok is jól jelölődtek.

Ultrastrukturális szinten a megfigyelt 5-HT-IR ideg-izom kapcsolatok finomszerkezete hasonlított a már korábban embrionális és juvenilis csigákban leírt jelölt varikozitásokhoz. A kis (0.5-1  $\mu\text{m}$ ) átmérőjű 5-HT-IR varikozitások mellett nagyobb méretűek (4-5.5  $\mu\text{m}$  átmérőjű) is előfordultak. A szoros, többnyire membránspecializáció mentes ideg-izom kapcsolatok mellett (23A ábra) találtunk az izomkötegtől viszonylag távolabb (100-200 nm) az extracelluláris térben elhelyezkedő jelölt axonvégződéseket is (23B-D ábra). Egyes 5-HT-IR varikózus axon nyúlványok hosszan elnyúlva futottak az izomsejtek között, azokat gliasejtek és nyúlványok kísérték. Az 5-HT-IR axonprofilok mellett gyakran találtunk azokkal társult, jelöletlen axon profilokat is. Ezekben a végződéseken is különböző ultrastrukturájú vezikula és granulum típusok voltak megfigyelhetőek (23C, D ábra).

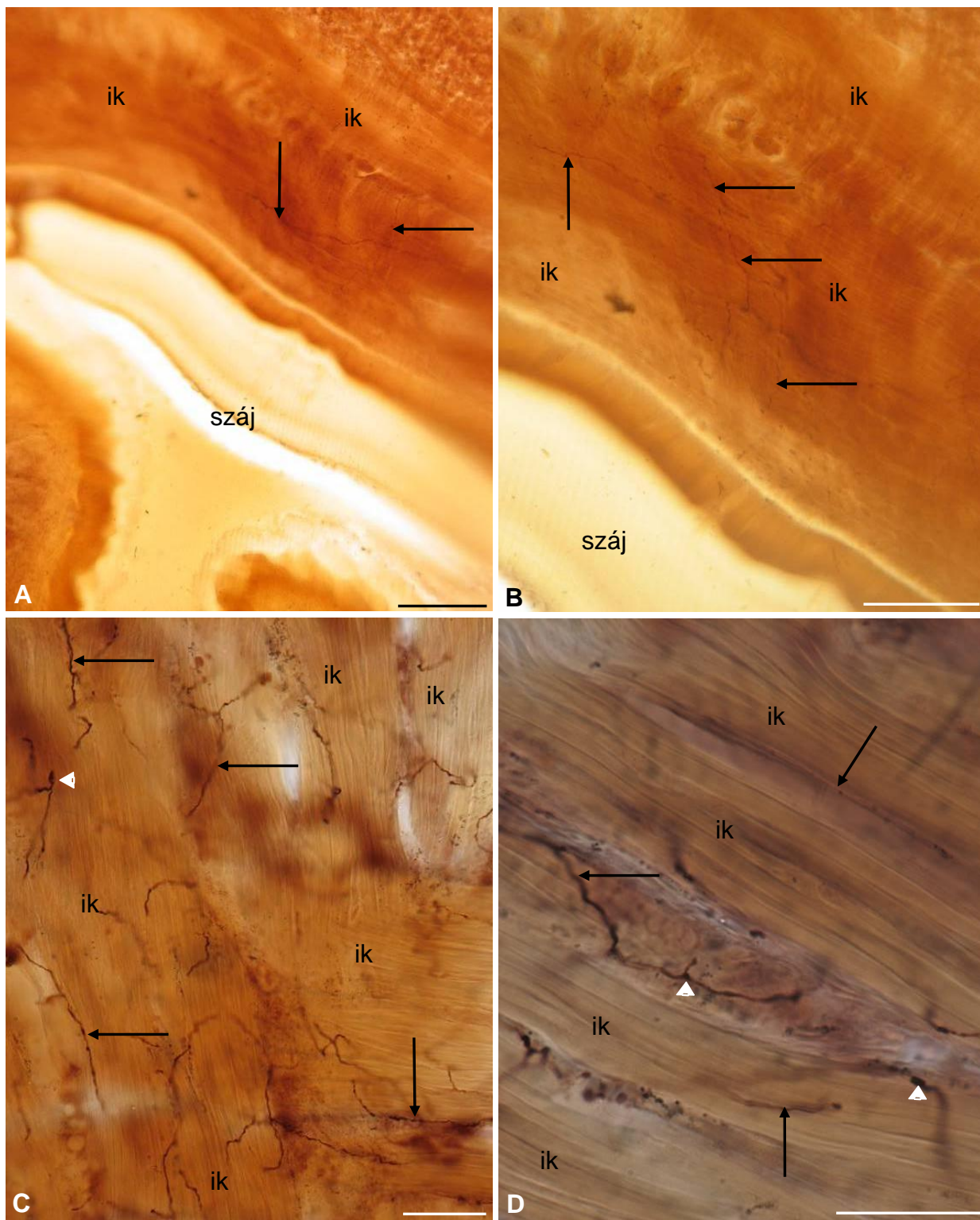


**20. ábra: Az embrionális pofaizomzat 5-HT-IR innervációjának ultrastrukturális képe. A-D: 5-HT-IR jelölt varikozitások (T) membránspecializáció nélküli kapcsolatot létesítenek (nyilak) az izomrostokkal (is) az E80%-os (A, B) és E100%-os (C, D) embrió pofaizomzatában. Az 5-HT-IR varikozitások zömében granuláris vezikulákat tartalmaznak (nyílhegy). A - jelöletlen axonprofil, m – mitokondrium. Aránymértékek: A, B: 0.4  $\mu$ m; C, D: 0.2  $\mu$ m**

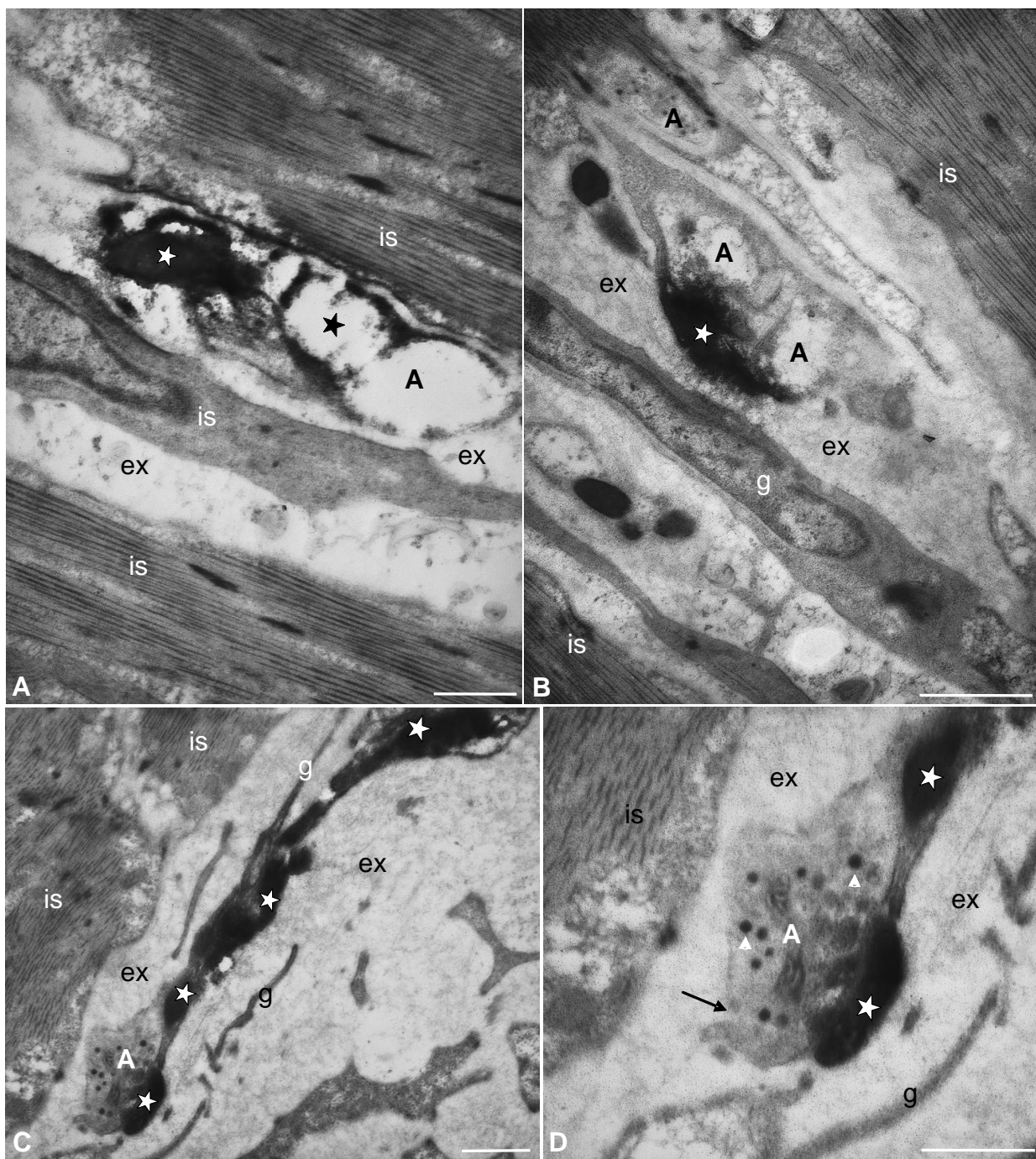


**21. ábra: A korai (P1) posztembrionális pofaizomzat 5-HT-IR innervációjának ultrastrukturális képe. A:** A hosszanti és a körkörös izomzat között hosszan elnyúló 5-HT-IR varikózus axon (T) innervál egy izomrostot (nyíl). m – mitokondrium, ex – extracelluláris tér. **B:** Egy kisméretű 5-HT-IR varikozitás mélyen beágyazódva létesít kapcsolatot egy izomrosttal (nyíl). Nyílhegy – granuláris vezikula, m – mitokondrium. Aránymértékek: 0.5  $\mu$ m.





**22. ábra: Az 5-HT-IR innerváció mintázata a felnőtt *Lymnaea* pofaizomzatában 50 µm-es Vibratome metszetekben.** A száj körüli pofaizomzatot felépítő hosszanti és körkörös izomkötegek (ik) sűrű 5-HT-IR innervációja (nyilak) kisebb (**A, B**), valamint nagyobb (**C, D**) nagyítású képeken hasonló mintázatot mutat. Nagyobb nagyításnál (**D**) az 5-HT-IR varokizítások is jól láthatók (nyílhegy). Aránymértékek: A, B: 10 µm, C, D: 50µm.

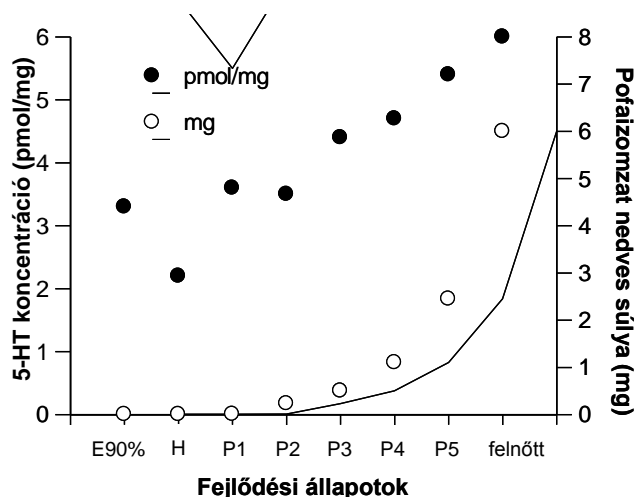


**23. ábra: Az 5-HT-IR innerváció ultrastrukturális képe a felnőtt csiga pofaizomzatában. A, B:** Jelölt varikozitások (csillagok) az izomsejtek (is) közvetlen közelében (A) vagy távolabb (B) azoktól. Aránymértékek: A: 0.2  $\mu$ m, B: 1  $\mu$ m. **C, D:** Egy 5-HT-IR varikózus axon nyúlvány (csillagok) kisebb (C) és nagyobb (D) nagyítási képe. A jelölt 5-HT-IR varikozitások a széles extracelluláris tér felé néznek. A jelöletlen varikozitás (A) granuláris (nyílhegy) és agranuláris vezikulákat is tartalmaz. A nyíl omega formájú membránbetűrődésre mutat. g – gliaelem. Aránymértékek: 1  $\mu$ m

## 5.2. A pofaizomzat szerotonerg innervációjának biokémiai jellemzése

### 5.2.1. A pofaizomzat 5-HT tartalma a fejlődő *Lymnaea*-ban

Filla és munkatársai (2009) korábban mérték az 5-HT koncentráció változását az embriogenezis során. Adataik alapján az 5-HT koncentráció alacsony marad az embrionális csiga késői posztmetamorfotikus (E60-65%) állapotáig, amikor egy gyors és szignifikáns növekedés következik be az 5-HT tartalomban. Minthogy a fiatalabb embriókból a pofaizomzat preparálása elegendő mennyiségben technikailag nem volt lehetséges, jelen vizsgálatainkat a késői embrionális (E90%-os), a kikelő, a juvenilis és a felnőtt korra összpontosítottuk. Az E90%-os, kikelő és a P1-P5 juvenilis, valamint a felnőtt csigák pofaizomzatában mért 5-HT koncentráció adatokat a 23. ábra foglalja össze. A késői, E90%-os stádiumú embriókban az 5-HT koncentráció 3.3 pmol/mg volt, mely a kikelő egyedek pofaizomzatában átmenetileg egy kissé lecsökkent (2.2 pmol/mg). Korai, P1 stádiumú juvenilis csigák pofaizomzatában az 5-HT koncentrációja (3.6 pmol/mg) ismét növekedésnek indult, mely ezt követően folyamatosan emelkedett a teljes poszttembrionális fejlődés alatt. A felnőtt egyedek pofaizomzata már 6 pmol/mg 5-HT-t tartalmazott. Összehasonlítva az 5-HT koncentráció alakulását a pofaizomzat nedves súlyának változásával a késői embrionális és poszttembrionális fejlődés alatt. Figyelemre méltó, hogy a pofaizomzat nedves súlya sokkal erőteljesebben, a kezdeti 0.091 mg-os tömegről a 66-szorosára, (6mg-ra) nőtt a poszttembrionális fejlődés végére, míg ezalatt az 5-HT koncentráció csak megkétszereződött.



**23. ábra: 5-HT koncentráció alakulása különböző fejlődési állapotban lévő *Lymnaea*-k pofaizomzatában.** Az 5-HT koncentrációja (átlag $\pm$ SEM) a poszttembrionezis során folyamatosan nő és mintegy 100%-os emelkedést mutat (E90% - 3.3 pmol/mg, P6 - 6 pmol/mg). A pofaizomzat tömegében ugyanakkor ennél sokkal erőteljesebben, mintegy 700%-os növekedés látható (E90% - 0.003 mg, felnőtt - 6 mg). H - kikelő, P - poszttembrionális állapot. Az ábra értékei hat párhuzamos mérés átlagértékei. A SEM nem haladta meg a  $\pm 10\%$ -ot.

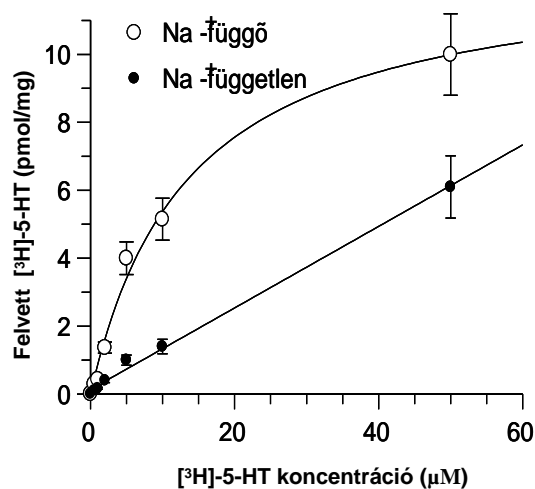
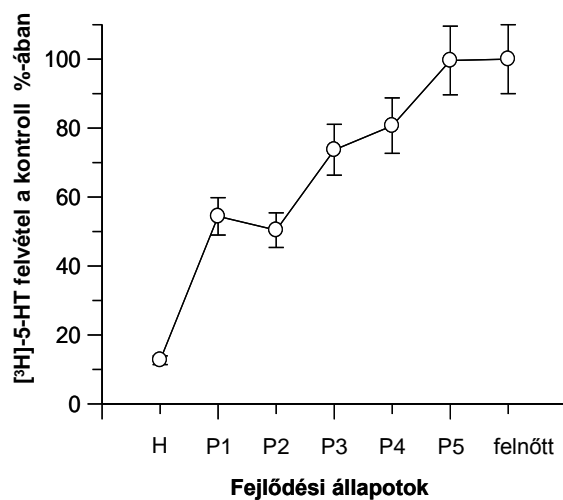
### 5.2.2. 5-HT felvétel és leadás a pofaizomzatban

Ahhoz, hogy az idegrendszerben jelenlévő kémiai anyag transzmitterként működjön, többféle kritériumot kell teljesítenie. Az egyik ilyen fontos feltétel, hogy ideg ingerlésre vagy magas  $\text{Na}^+$  koncentráció hatására kiváltott depolarizációra felszabaduljon, illetve legyen egy olyan mechanizmus, mely a felszabadult transzmitter hatását pre- vagy poszt-szinaptikus irányú visszavétellel megszünteti. Az 5-HT transzmitter szerepének igazolása céljából P5-ös stádiumú juvenilis *Lymnaea* pofaizomzatában vizsgáltuk az 5-HT felszabadulását, ill. a felszabadult 5-HT visszavételét, mely utóbbi egy specifikus transzporter fehérje közvetítésével valósul meg (Sadamoto és mtsai, 2008). Az 5-HT transzporter jelenlétét *Lymnaea* KIR-ben in situ hibridizációval igazolták és kimutatták azt is, hogy celluláris lokalizációja egyezést mutat az 5-HT-IR neuronok eloszlásával. A mérés technika egyszerűsítése miatt kísérleteink során a P5 állatok pofaizomzatát használtuk.

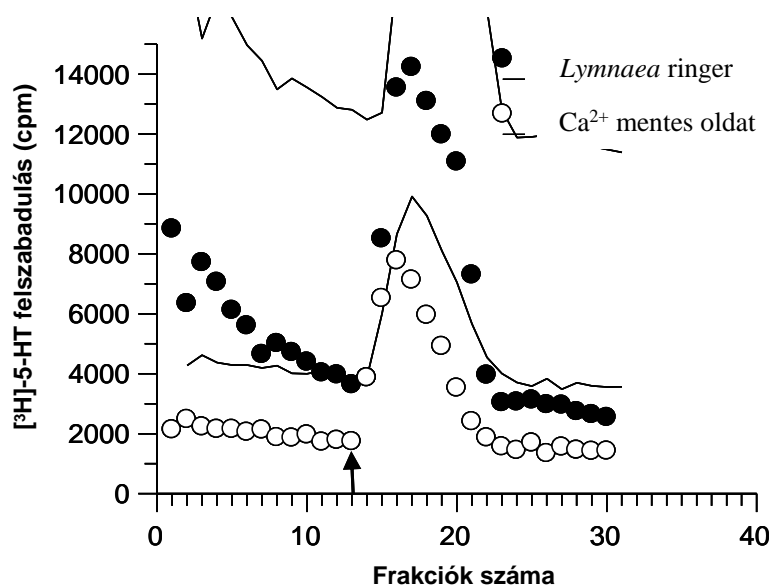
Kísérleteink egyértelműen igazolták, hogy az 5-HT felvétel egy aktív,  $\text{Na}^+$ -függő folyamat. A  $\text{Na}^+$  mentes oldatban a  $\text{Na}^+$  független (inszenzitív) 5-HT felvételt, míg normál *Lymnaea* fiziológias oldatban a teljes 5-HT felvételt mértük. A  $\text{Na}^+$  független 5-HT felvételt kivonva a teljes 5-HT felvételtől megkaptuk a  $\text{Na}^+$ -függő (szenzitív) 5-HT felvételt, mely telítési görbével jellemezhető. Az 5-HT felvétel kinetikai paramétereit vizsgálva megállapítottuk, hogy a felvétel nagy affinitású, az akkumulációs folyamat  $K_M$  13.65  $\mu\text{M}$ , és a felvétel maximális sebessége, a  $V_{\max}$  12.7 pmol/mg volt (25A ábra).

A poszttembriogenezis elején (kikeléstől a korai, P1 juvenilis állapotig) az 5-HT felvételben egy szignifikáns növekedés volt megfigyelhető (12.7%-ról 54.4%-ra nőtt az  $[^3\text{H}]$ -5-HT felvétel), melyet egy mérsékeltebb, de folyamatos növekedés követett a későbbi poszttembriogenezis során (25B ábra).

Ha juvenilis (P5) csigák pofaizomzatát  $[^3\text{H}]$ -5-HT felvételt követően a perfúziós kamrában normál fiziológias oldattal mostuk át spontán  $[^3\text{H}]$ -5-HT felszabadulás volt mérhető. Ha a fiziológias oldat  $\text{K}^+$  koncentrációját 100 mM-ra emeltük, depolarizáció miatt az 5-HT felszabadulásban jelentős növekedést lehetett mérni (a beütések száma több mint 10000 cpm-el nőtt) (26. ábra). Az  $[^3\text{H}]$ -5-HT felszabadulást  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes oldatban is vizsgáltuk azt bizonyítandó, hogy a  $\text{K}^+$  által kiváltott 5-HT felszabadulás a szekretoros vezikulák és a plazmamembrán fúzióját követő exocitotikus folyamat eredménye. Ekkor a  $\text{K}^+$  stimulált 5-HT felszabadulás mértéke jelentősen csökkent.

**A****B**

**25. ábra: 5-HT felvétel a pofaizomzatban.** A: A [<sup>3</sup>H]-5-HT felvétel kinetikája juvenilis (P5) *Lymnaea* pofaizomzatában. A Na<sup>+</sup> független 5-HT felvétel egyenesen arányos a radioaktív ligand koncentrációjával (fekete pontok), míg a Na<sup>+</sup> függő 5-HT felvétel telítési kinetikát mutat (nyitott körök). B: [<sup>3</sup>H]-5-HT felvétele kikelő (hatchling) és juvenilis (P1-P5) *Lymnaea*-k pofaizomzatában. A P1 juvenilis stádiumú csigák 5-HT felvétele több mint a négyszeresére nőtt, melyet egy lassabb, de folyamatos növekedés követett a posztembriogenezis további szakaszaiban. Az ábra értékei három párhuzamos mérés átlagértékei.



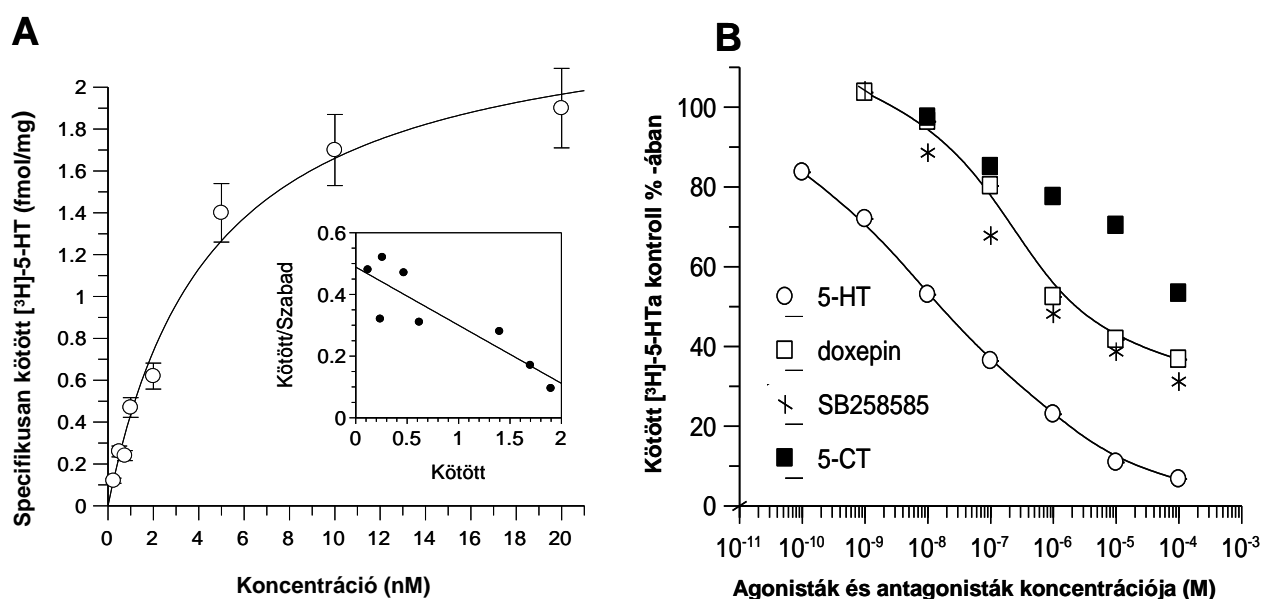
**26. ábra: [<sup>3</sup>H]-5-HT felszabadulás késői (P5) juvenilis *Lymnaea* pofaizomzatában.** A 100 mM K<sup>+</sup>-ot tartalmazó *Lymnaea* fiziológiai oldat 5-HT felszabadulást váltott ki (fekete körök), míg a Ca<sup>2+</sup>-mentes oldatban a K<sup>+</sup> stimulált [<sup>3</sup>H]-5-HT felszabadulás csökkent (üres körök). Az ábra három párhuzamos mérés átlagértékeit mutatja. A SEM nem haladta meg a ±10%-ot.



### 5.2.3. [ $^3\text{H}$ ]-5-HT kötődés jellemzése a pofaizomzatban

A pofaizomzatban jelen lévő 5-HT receptorok kinetikai paramétereinek meghatározásához a receptor kötést különböző koncentrációjú [ $^3\text{H}$ ]-5-HT-val vizsgáltuk P5 és felnőtt stádiumú csigák pofaizomzatából készült membrán preparátumokban. Megállapítható volt, hogy az 5-HT koncentráció függő kötődése telítési görbével jellemezhető. A görbe kinetikai analízise nagy affinitású receptor jelenlétét igazolta ( $K_d = 4,5 \text{ nM}$ ). A maximális kötőhelyek száma  $B_{\max} = 2.4 \text{ fmol/mg}$  volt. A telítési görbéből szerkesztett Scatchard-egyenes ugyancsak egyetlen kötőhely jelenlétét igazolta (27A ábra).

További kísérleteink során kimutattuk, hogy az 5-HT már alacsony koncentrációban is gátolta a jelzett 5-HT kötődését (50%-os gátlást közel  $10^{-8} \text{ M}$ -os koncentrációban váltott ki), míg az 5-CT csak magas,  $10^{-4} \text{ M}$ -nál nagyobb koncentrációban volt képes 50 %-os gátlásra, tehát affinitása alacsony volt az 5-HT receptorhoz. Az alkalmazott 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonisták gátolták a jelzett 5-HT kötődését. Az SB 258585  $2 \times 10^{-6}$ , míg a doxepin  $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ -os koncentrációban okozott 50 %-os gátlást (27B ábra).

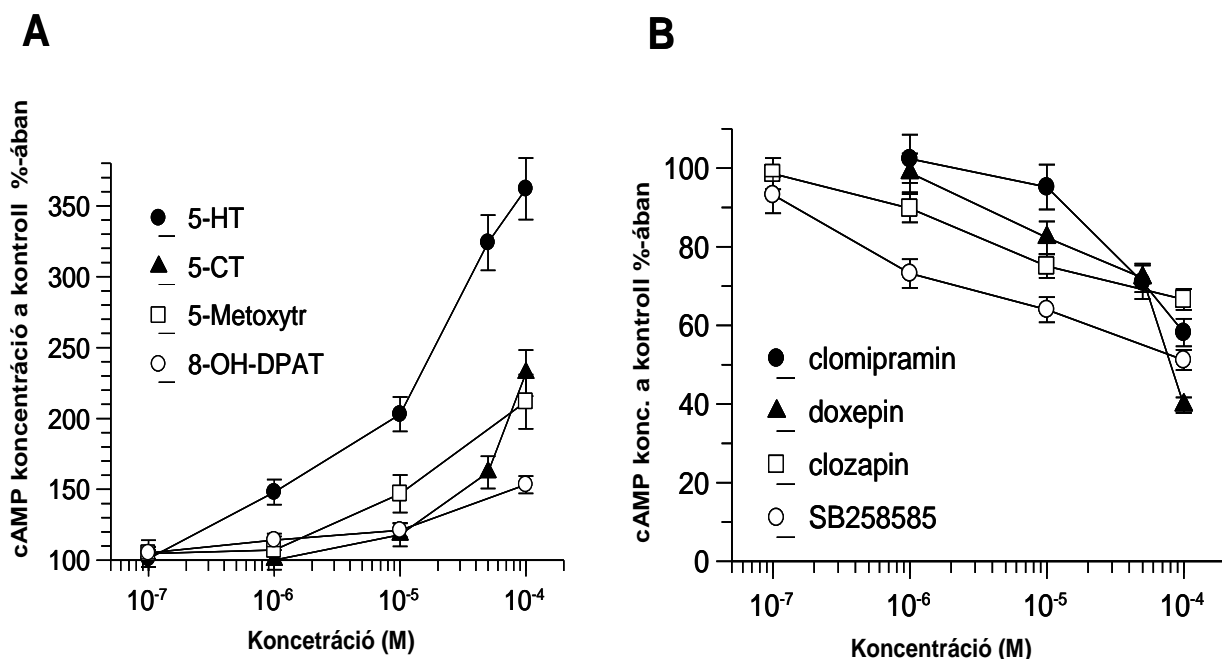


**27. ábra:** **A:** [ $^3\text{H}$ ]-5-HT kötődés telítési görbéje P5 és felnőtt pofaizomzatzból készült membrán preparátumban. Az ábra három párhuzamos mérés átlagértékeit  $\pm \text{SEM}$  mutatja. **Beillesztett ábra:** A telítési görbéből számolt Scatchard-egyenes. **B:** 5-HT receptor agonisták (5-HT, 5-CT) és antagonisták (Doxepin, SB258585) gátló hatása a [ $^3\text{H}$ ]-5-HT kötődésre. Az ábra három párhuzamos mérés átlagértékeit mutatja. A SEM nem haladta meg a  $\pm 10\%$ -ot.

#### 5.2.4. Adenilát cikláz aktivitás a pofaizomzatban

Az előzetes vizsgálatok azt mutatták, hogy az 5-HT stimulálja az AC aktivitását a juvenilis és a felnőtt csigák pofaizomzatában is, ezért a mérések eredményessége érdekében kísérleteink során a felnőtt állatok pofaizomzatát inkubáltuk 5-HT-val vagy annak agonistáival (5-CT, 8-OH-DPAT, 5-metoxitriptamin). Az 5-HT receptorokon keresztül az AC aktiválódik, majd ennek következtében megnövekszik a szövet cAMP koncentrációja (28A ábra). A szöveti cAMP koncentrációját leghatásosabban az 5-HT növelte. A hatásossági sorrend a következő volt: 5-HT>5-metoxitriptamin>5-CT>8-OH-DPAT.

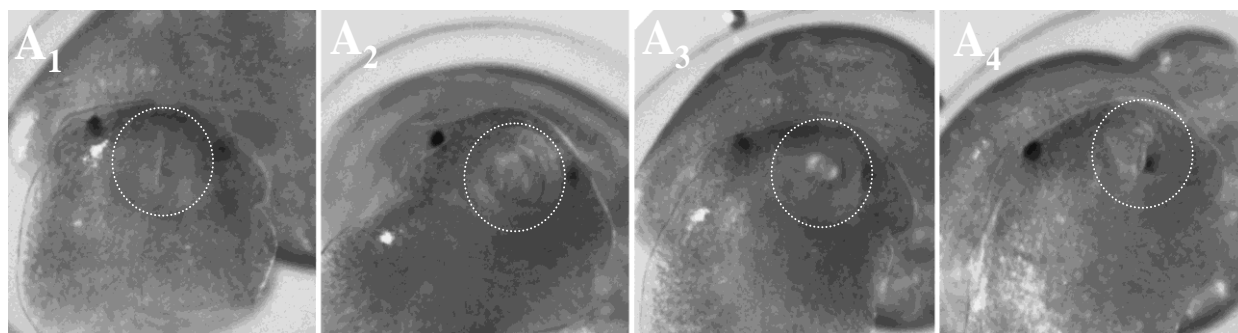
Megállapítható volt, hogy az alkalmazott 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonisták (SB252585, clozapin) és az 5-HT<sub>6</sub> receptort gátló antidepresszánsok (clomipramin and doxepin) gátolták az 5-HT által stimulált AC aktivitását, melynek következtében csökkent szöveti cAMP koncentrációt mértünk (28B ábra). Leghatásosabban az SB258585 gátolt, ezt követte a clozapin, míg a clomipramin és a doxepin csak nagy koncentrációban okozott az előbbiekhöz hasonló mértékű gátlást.



**28. ábra: A:** AC stimulációja 5-HT-val és egyes agonistáival a felnőtt *Lymnaea* pofaizomzatában. A cAMP szintet a legerősebben az 5-HT emelte meg, melyet az 5-metoxitriptamin és az 5-CT, majd végül a 8-OH-DPAT követett. Az ábra négy párhuzamos mérés átlagértékeit mutatja. **B:** Az 5-HT által stimulált AC gátlása felnőtt *Lymnaea* pofaizomzatában 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonistákkal és antidepresszánsokkal. Az ábra négy párhuzamos mérés átlagértékeit mutatja.

### 5.3. A táplálkozásban részt vevő 5-HT receptorok *in vivo* fiziológiai-farmakológia jellemzése

Voronezhskaya és munkatársai (1999) eredményei szerint a rendszeres reszelőnyelv (radula) kitűrés, mely a felnőttszerű táplálkozás egyik ismertető jele, E85%-os stádiumú embrióktól kezdve már megfigyelhető, mely ezt követően E90%-tól már rendszeressé válik. A táplálkozási ritmusban négy fő fázist lehet megkülönböztetni (29. ábra). Elsőként a szájnyílás nyílik ki (28A<sub>1</sub> ábra), melyet a radula kitűrése követ (29A<sub>2</sub> ábra). A táplálék lereszelése után (28A<sub>3</sub> ábra), a radula visszahúzása következik (29A<sub>4</sub> ábra), melyet követően a száj ismét bezárul. Az E100%-os stádiumú csiga átlagos radula kitűrés száma kontroll körülmények között  $11 \pm 4$  per perc volt ( $n=204$ ). Különböző koncentrációkban különböző 5-HT<sub>erg</sub> farmakonokat alkalmaztunk (2. táblázat). Annak eldöntésére, hogy mely 5-HT receptorok vehetnek részt a táplálkozás (reszelőnyelv kitűrés) szabályozásában. Kísérleteinkben E100%-os embriók radulamozgását vizsgáltuk.



**29. ábra: A radula kitűrésének 4 fő fázisa.** A<sub>1</sub> – A szájnyílás nyitása, A<sub>2</sub> – a reszelőnyelv kitűrése, A<sub>3</sub> – reszelési fázis, A<sub>4</sub> – a reszelőnyelv visszahúzása. A száj régióját fehér kör jelzi. *In vivo* CCD kamera felvételek.

Eredményeink szerint 5-HT 1 és 2  $\mu$ M-os koncentrációban serkentette a reszelőnyelv kitűrését, azonban ezzel párhuzamosan stimulálta az embrió mozgását is és az nehézkessé tette a radula kitűrésének megbízható megszámolását. Ezért kísérleteinkben 5-HTP-t, az 5-HT prekursorát alkalmaztuk. 10  $\mu$ M 5-HTP 15 perc elteltével kontrollhoz képest 7%-kal csökkentette a reszelőnyelv kitűrését, mely 45 perces kezelés után már szignifikánsan 43%-kal csökkent ( $n=10$ ). Ezzel szemben 100  $\mu$ M 5-HTP 15 perc elteltével 21%-kal növelte a harapások számát és ez a hatás 45 perc után is fennmaradt ( $n=21$ , 30A ábra).

Az 5-HT felvételét (re-uptake) gátló clomipramin, mely egyben az 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonistája is, 15 perc elteltével 11%-kal, majd 45 perc elteltével szignifikánsan, 82%-kal csökkentette a radula aktivitását ( $n=10$ , 30B ábra).

Az 5-HT szintézist blokkoló pCPA 5  $\mu$ M-os koncentrációban, a reszelőnyelv kitűrést folyamatosan és hosszantartóan csökkentette, melynek során 330 perc elteltével a reszelőnyelv kitűrések száma 35%-kal csökkent. Ha ezt követően 100  $\mu$ M-os koncentrációjú 5-HTP kezelést alkalmaztunk már 15 perc elteltével a reszelőnyelv kitűrések száma kontroll aktivitás 83%-ára nőtt, majd 45 perc után közelítette a kontroll értéket (94%) (n=11, 30C ábra).

Az 5-HT<sub>1,5,7</sub> receptor agonista 5-CT már kis (0.1  $\mu$ M) koncentrációban is szignifikánsan, 44%-ra csökkentette a radula kitűrésének számát 15 perc után, mely 45 perc elteltével tovább csökkent 40%-ra. Nagyobb, 0.5  $\mu$ M-os koncentrációban 15 perc elteltével erőteljesebben (5.7%) csökkentette a reszelőnyelv mozgási aktivitását, majd 45 perc elteltével teljesen blokkolta azt (n=10, 30D ábra).

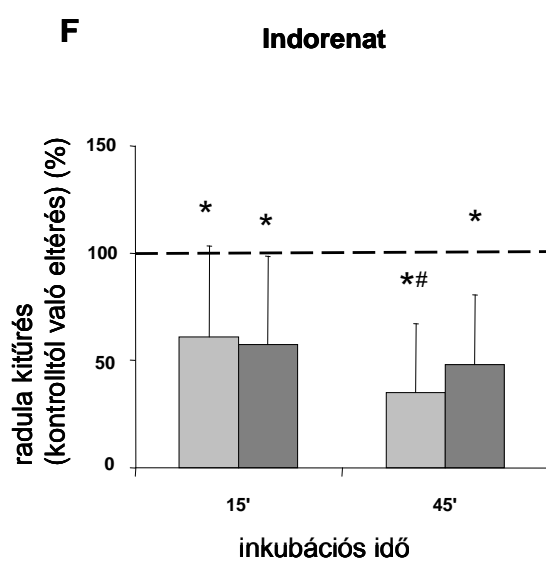
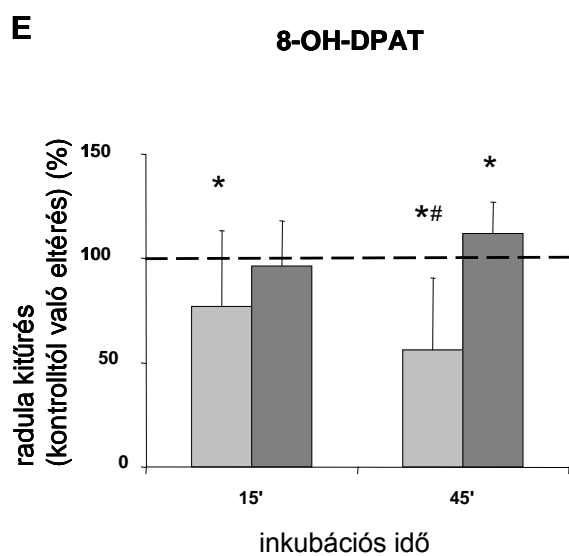
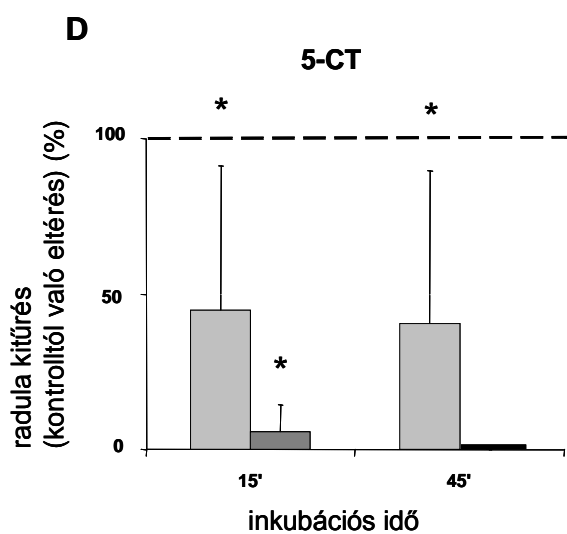
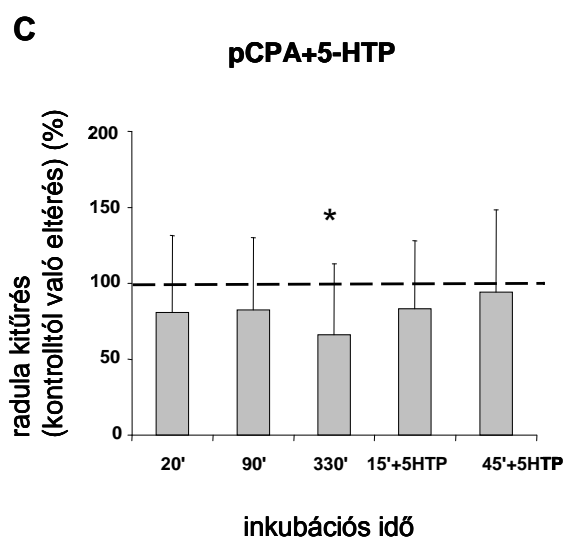
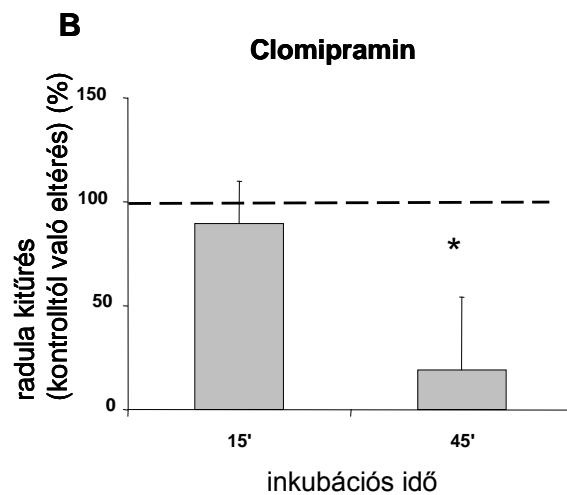
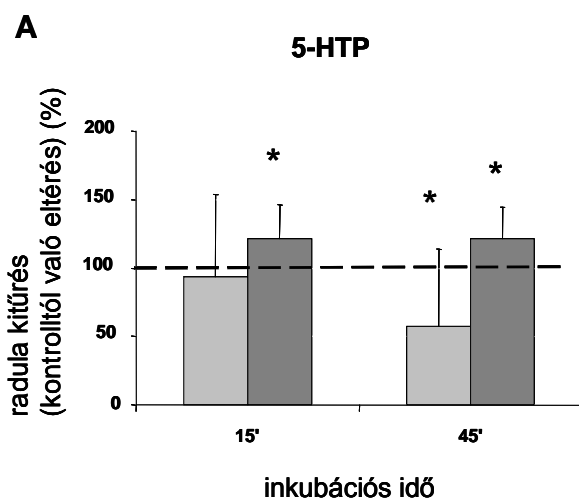
Az 5-HT<sub>1,7</sub> receptor agonista 8-OH-DPAT 0.1  $\mu$ M-os koncentrációban szignifikáns csökkenést okozott a táplálkozási aktivitásban; 15 perc elteltével 77%-ra, 45 perc elteltével pedig 56%-ra csökkentve azt. Ezzel szemben nagyobb, 1  $\mu$ M-os koncentrációban az agonistának 15 perces inkubálás után nem volt szignifikáns hatása (96%), sőt 45 perc elteltével kis mértékben növelte (111%) is a radula aktivitást (n= 21, n=9, 30E ábra).

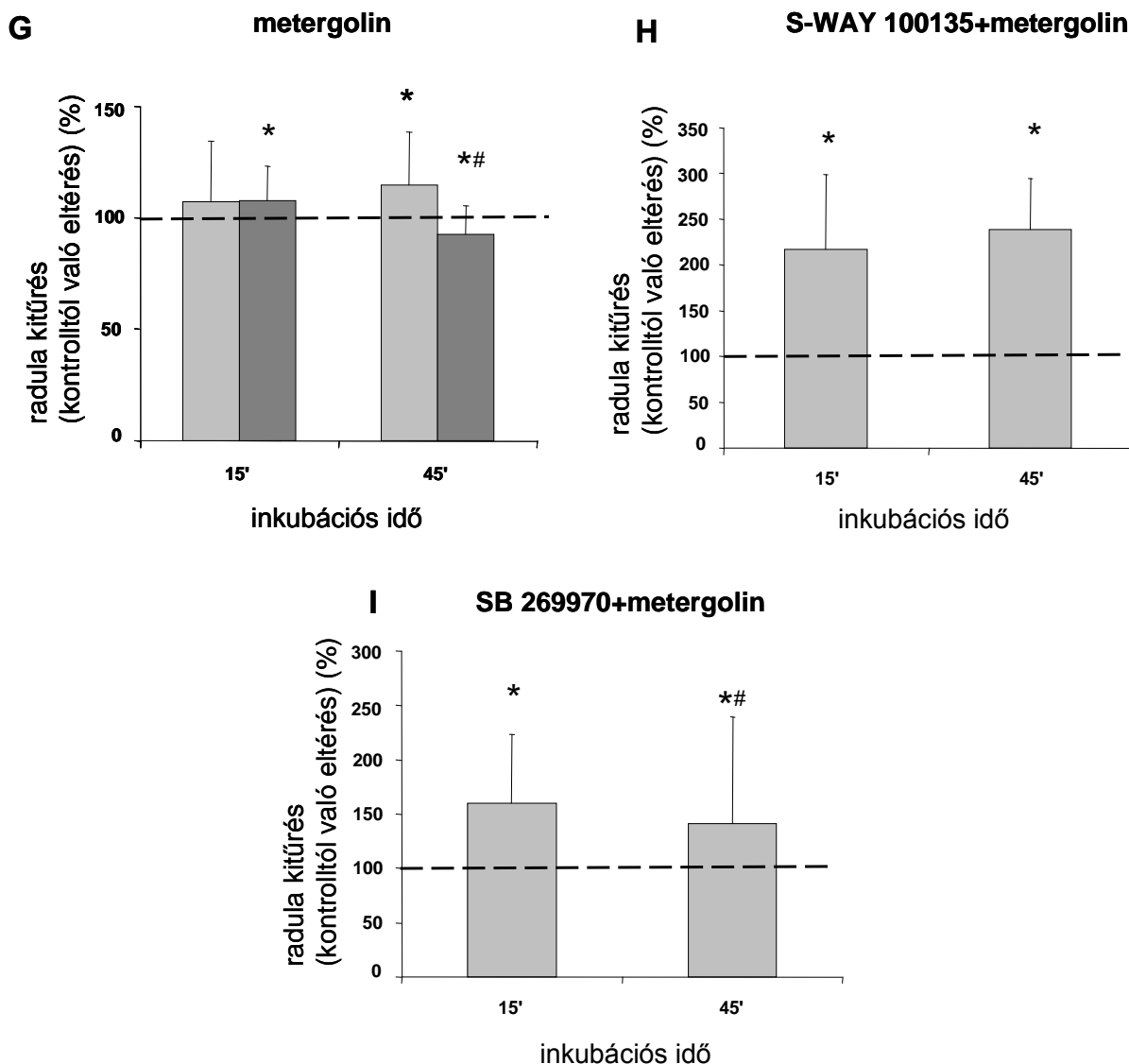
Az 5-HT<sub>1,2</sub> receptor agonista indorenat, 0.5 és 2  $\mu$ M-os koncentrációban is szignifikánsan csökkentette a reszelőnyelv kitűrését. 0.5  $\mu$ M-os koncentrációban 15 perc elteltével 40%-kal, 45 perc elteltével pedig 66%-kal csökkentette azt. A 2  $\mu$ M-os koncentrációjú indorenat kezelés 15 perc elteltével a reszelőnyelv kitűrését 43%-kal, 45 perccel később pedig majd 53%-kal csökkentette. (n=5, n=5, 30F ábra).

Az alacsony (1 $\mu$ M) koncentrációban alkalmazott 5-HT<sub>6,7</sub> receptor agonista és 5-HT<sub>1</sub> receptor antagonistá metergolin, 107 illetve 115%-ra növelte a táplálkozási ritmust 15 és 45 perc elteltével, míg nagyobb, 5  $\mu$ M-os koncentrációban 15 perc után 107%-ra emelte, majd 45 perc elteltével 8%-kal csökkentette azt (n=17, n=10, 30G ábra).

Az alkalmazott antagonisták közül az 5-HT<sub>1</sub> receptor antagonistá S-WAY 100135 (1  $\mu$ M) metergolinnal együtt (0.5  $\mu$ M) több mint kétszeresére (216% és 236%-ra) növelte a radula kitűrésének az aktivitását 15 és 45 perc után (n=11, 30H ábra).

Az 5-HT<sub>7</sub> receptor antagonistá, SB 269970 (1  $\mu$ M) a metergolin (0.5  $\mu$ M) serkentő hatását nem blokkolta. A reszelőnyelv kitűrések száma 15 perc elteltével 159%-ra nőtt, majd 45 perc után enyhén 141%-ra csökkent (n=23, 30I ábra).





**29. ábra: Különböző 5-HTerg farmakonok hatása a reszelőnyelv kitűrésének frekvenciájára.** **A:** Az 5-HTP koncentráció függően befolyásolta a táplálkozási aktivitást. 10 μM 5-HTP (világos oszlop) szignifikánsan 43%-kal csökkentette, míg a 100 μM 5-HTP (sötét oszlop) folyamatosan stimulálta a reszelőnyelv kitűrést. **B:** Clomipramin szignifikánsan, 18%-ra csökkentette le a táplálkozási aktivitás 45 perces inkubációs idő után. **C:** pCPA hosszantartó 330 perces inkubációja után a reszelőnyelv kitűrések száma 35 %-kal csökkent, melyet a 45 perces 5-HTP kezelés ismét a kezdeti kontroll értékre emelt. **D:** Az 5-CT erőteljesen, koncentrációfüggően csökkentette a táplálkozási aktivitást. **E:** 8-OH-DPAT koncentráció függő hatása a táplálkozási aktivitásra. **F:** Indorenat 0.5 (világos oszlop) és 2 μM-os (sötét oszlop) koncentrációban is szignifikánsan csökkentette a reszelőnyelv kitűrését. **G:** 0.5 μM metergolin (világos oszlop) enyhén növelte, míg 5 μM-os koncentrációban (sötét oszlop) enyhén csökkentette a táplálkozási ritmust. **H:** 1 μM S-WAY100135 metergolinnal kombinált inkubálás tartósan szignifikáns növekedést váltott ki, a reszelőnyelv kitűrésének a száma a kétszeresére nőtt. **I:** Az SB269970 (1 μM) és metergolin (0.5 μM) együttes alkalmazása hosszantartó, serkentő hatással volt a reszelőnyelv aktivitásra.

## 6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A nagy mocsári csiga pofaizomzatának működése, mint minden perifériás szervé, az idegrendszer irányítása alatt áll. Disszertációmban a pofaizomzat 5-HTerg szabályozó rendszerének kialakulását vizsgáltam anatómiai, biokémiai és farmakológiai-fiziológiai módszerekkel az embriogenezis és a posztembriogenezis során. Először a rendszer kémiai-neuroanatómiai, hisztokémiai és ultrastrukturális szintű elemzését végeztem el, majd a funkcionális neurokémiai tulajdonságokat elemeztem, végül azonosítottam a pofaizomzat 5-HTerg szabályozásban részt vevő 5-HT receptorokat.

### 6.1. A szerotonerg rendszer fejlődése a *Lymnaea stagnalis* pofaizomzatában

Minden eddig tanulmányozott puhatestű faj közös tulajdonsága, hogy az 5-HT tartalmú sejtek már korán megjelennek a fejlődő idegrendszerben. Számos fajban az 5-HTerg rendszer első elemei a periférián, az embrionális apikális ganglionban jelennek meg, mely az embriogenezis végén eltűnik (Marois 1997a; b; c; Page és mtsai, 2000). *Lymnaea*-ban az első 5-HT-IR sejtek az E35%-os embrionális stádiumban a KIR-ben figyelhetők meg. Ezek a cerebrális ganglion páros C4-es idegsejtjei (Marois and Croll, 1992), melyek homológjait *Helisoma*-ban ECN1 sejteknek nevezik (Goldberg és Kater, 1989). *Lymnaea*-ban az embrionális fejlődés alatt további neuronok jelennek meg a cerebrális és a pedális ganglionban közvetlenül a metamorfózis előtt és után is (Marois és Croll, 1992). Az 5-HT-IR elemek korai központi megjelenésével ellentétben a *Lymnaea* pofaizomzat 5-HTerg innervációja viszonylag későn kezd kialakulni, majd ezt követően egy gyors fejlődés következik be a késői embriogenezis és korai posztembriogenezis folyamán.

Immunhisztokémiai eredményeink szerint míg az E60%-os fejlettségű embrió KIR-ében már számos 5-HT-IR sejtet és axonnyúlványt lehet azonosítani, addig a pofaizomzat ekkor még nem tartalmaz 5-HT-IR elemeket. Az izomzat fejlődésével, érésével párhuzamosan jelennek meg az E80%-os embrionális fejlettségű csigák pofaizomzatában az első 5-HT-IR axon nyúlványok, köztük néhány varikózus elem. Ezek az 5-HT-IR axonok még vékonyak és elszórtan helyezkednek el a pofaizomzat felszínén. Az E100%-os és az éppen kikelő csigák pofaizomzatában az 5-HT-IR axon nyúlványok sűrűsége jelentős mértékben megnő. Az embriogenezis végén (E100%) a pofaizomzatban az 5-HT-IR axonok már sűrű hálózatot

alakítanak ki a mélyebb izomrétegekben is. A pofaizomzat fejlődése, érése nem fejeződik be az embriogenezis végére; a kikelő csiga pofaizomzatában az 5-HT-IR innerváció már funkcionálisan is érett képet mutat és ezt követően a pofaizomzat 5-HTerg innervációs rendszerének mintázata a P1-P2-es posztembrionális csigákban már kialakultnak tekinthető. Ezzel párhuzamosan az 5-HT-IR rendszer a teljes KIR-ben, így a cerebrális és a pofaganglionban is hatalmas fejlődésen megy keresztül, mely mind a neuronszámban, mind az arborizációs és a projekciós rendszerekben tükröződik (Marois és Croll, 1992). Ez jól korrelál Croll és Chiasson (1989) korábbi eredményeivel, akik megfigyelték, hogy habár a kikelő csiga KIR-jében már majdnem az összes, a felnőtt csigák KIR-ében is jelenlevő 5-HT-IR sejtcsoport megtalálható, azokhoz további jelölt sejtek és sejtcsoportok adódnak a posztembrionális fejlődés során. Úgy tűnik, hogy nincs éles határ a pofaizomzat 5-HT-IR idegi elemeinek fejlődésében a késői embrionális és a juvenilis állapotok között, de nyilvánvaló, hogy a posztembrionális fejlődés során bekövetkező változások is fontos szerepet játszanak a végleges, a felnőtt korra jellemző táplálkozó életmód kiteljesedésében, finomhangolásában, mely véglegesen a posztembriogenezis során teljeseedik ki.

Eredményeink szerint a pofaizomzat 5-HTerg innervációs rendszerében mennyiségi és minőségi változás következik be az E80% és E90%-os embrionális fejlődési stádiumok között. Ez jól korrelál azzal a megfigyeléssel, hogy az E80-85%-os fejlettségű *Lymnaea* embrió mutat először felnőtt-szerű táplálkozási magatartási formát, a reszelőnyelv kitűrését, azaz a pofarégióknak ekkorra már funkcionálisan készen kell állnia e “művelet” végrehajtásához. A pofaizomzat 5-HTerg elemeinek viszonylag késői megjelenése az embrionális fejlődés során a teljesen intrakapszuláris, azaz tojáson belüli embrionális fejlődéshez kapcsolható. Az embriogenezis 8-10 napig tart és ez alatt az állat teljes metamorfózison megy keresztül. Az embriók csak a metamorfózis után lassan kezdenek átváltani a forgó mozgásról a felnőtt-szerű helyváltoztató csúszó mozgásra, és ezt követően mutatnak felnőtt-szerű táplálkozási magatartási formát, rendszeres radula kitűrést. A tojáson belüli fejlődés során az aktív táplálkozási forma a létfenntartás szempontjából nem lényeges, de fontos szerepet játszhat az embrionális élet utáni, a tojáson kívüli életre való felkészülésben.

A pofaizomzat 5-HT-IR innervációjának fejlődése jó összhangban áll magának a pofaizomzatnak a késői fejlődésével is, mely a metamorfózis után (E65%) még csak néhány izomkötegből álló fejletlen struktúra. Ez az egyszerű felépítésű izomzat rövid idő alatt egy gyors és erőteljes fejlődésen megy keresztül és a kikelő csiga pofaizomzatát már egy sokkal



összetettebb, többrétegű hosszanti és körkörös elrendeződésű izomrendszere építi fel, mely már funkcionális alapja az ekkor a már rendszeressé váló ritmikus reszelőnyelv kitűrésnek.

Az 5-HT részvételét a táplálkozás (pofaizomzat aktivitásának) szabályozásában a *Lymnaea* egyedfejlődése alatt biokémiai kísérleteink eredményei is egyértelműen bizonyítják. Az 5-HT koncentráció az E90%-os csigáktól kezdve a juvenilis csigák pofaizomzatában a posztembriogenezis alatt folyamatosan növekszik, leszámítva egy kisebb visszaesést a kikelő csigákban. Egy tengeri kagyló, a *Pecten maximus* lárvájában a metamorfózishoz közeli állapotban az 5-HT tartalom szintén jelentős növekedést mutatott, majd ezt követően egy éles csökkenés jellemezte a posztlárvális életszakaszt (Cann-Moisan és mtsai., 2002). Filla és mtsai (2009) kimutatták, hogy az 5-HT az embrionális fejlődés igen korai szakaszában, már E12%-os stádiumban is jelen van *Lymnaea*-ban. Ennek szintje azonban lényegében nem változik az E80%-os stádium eléréséig, az csak kis koncentrációban mérhető. A fejlődés további szakaszában a kikelésig hátralévő két nap alatt az 5-HT koncentrációja jelentősen, 300%-kal megemelkedik, miközben az embriók (és maga a pofaizomzat) mérete is látványos mértékben megnő. Ezek az eredmények, valamint a saját biokémiai méréseink is jól mutatják, hogy az 5-HT koncentráció alakulása és a 5-HTerg rendszer késői fejlődése szoros korrelációt mutat.

Jelenlegi ismereteink szerint a pofaizomzatot innerváló 5-HTerg rendszernek elsődleges eleme az 5-HTerg óriásneuron, a CGC, mely kulcsszereplője a KIR-ben leírt táplálkozási hálózatnak (Elliot és Susswein, 2002). A metamorfózis után a *Lymnaea* embrióban mindkét cerebrális ganglionban megjelenő egy-egy óriás 5-HT tartalmú sejt, a CGC sejtek nyúlványrendszere fokozatosan kiteljesedik és az embriogenezis végére beidegzi mindkét bukkális gangliont, illetve a pofaizomzatot (ugyancsak Marois és Croll, 1992). Az E100%-os fejlettségi stádium elérésekor, amikor vizsgáltuk a radula mozgást, már jelen van a bukkális ganglionok motoneuronjait sűrűn körülvevő 5-HT-IR perikarionális kosár (Voronezhskaya és mtsai., 1999), mely további szintje lehet a táplálkozás 5-HTerg szabályozásának. Az eredményeinkből arra következtetünk, hogy a felnőtt szerű embrió "fiktív" táplálkozását az 5-HT már hasonló módon szabályozza, mint a szabadon mozgó és aktívan táplálkozó juvenilis, illetve felnőtt csiga esetében. Az embrió táplálkozási viselkedésének érése igen jól párhuzamba állítható az 5-HT szint erőteljes növekedésével és az 5-HT-IR elemek fokozódó megjelenésével a bukkális és cerebrális ganglionokban. Valószínűsíthető, hogy a kései 5-HT koncentráció emelkedés a CGC innerváció késői perifériás kiterjedésével, a pofaizomzat 5-HTerg innervációjának késői éréseivel függ össze.

Az 5-HT felvételével és leadásával kapcsolatos kísérleteink a *Lymnaea* pofaizomzatában funkcionáló 5-HTerg transzmissziót igazolják. A *Lymnaea* pofaizomzatában [<sup>3</sup>H]-5-HT-vel történő inkubálást követően a jelölt 5-HT specifikusan akkumulálódott. A Na<sup>+</sup>-függő (szenzitív) [<sup>3</sup>H]-5-HT felvétel különböző inhibitorokkal gátolható volt, egyben az 5-HT felvétel telíthető volt. Az akkumulációs folyamat K<sub>m</sub> és V<sub>max</sub> értékei alapján megállapítható volt, hogy az 5-HT felvétel nagy affinitású, és a funkcionálisan aktív uptake rendszer a posztembrionális fejlődés során folyamatosan erősödik. A posztembriogenezis elején (kikeléstől a korai, P1 juvenilis állapotig) az 5-HT felvételben egy gyors, szignifikáns növekedés figyelhető meg, melyet egy mérsékeltebb, de folyamatos növekedés követett a későbbi posztembriogenezis során, majd a korai felnőtt stádiumra elérte maximális hatásfokát. Az is kimutatható volt, hogy pofaizomzatban a felvett [<sup>3</sup>H]-5-HT spontán módon felszabadul a fiziológias oldattal való átmosás közben. A perfúziós oldatban 100 mM-ra emelt K<sup>+</sup> koncentráció jelentős mértékben növelte a [<sup>3</sup>H]-5-HT felszabadulást. Az [<sup>3</sup>H]-5-HT felszabadulást Ca<sup>2+</sup>-mentes oldatban is vizsgáltuk. Eredményeink arra utaltak, hogy a K<sup>+</sup> által kiváltott 5-HT felszabadulás mértéke jelentősen csökkent, feltételezhetően az a szekretoros vezikulák és a plazmamembrán fúzióját követő exocitotikus folyamat eredménye. Ez a rendszer egykomponensű, a magas koncentrációjú K<sup>+</sup> stimulálta, míg Ca<sup>2+</sup>-al való helyettesítése gátolta azt, vagyis elmondható, hogy a [<sup>3</sup>H]-5-HT felszabadulás Ca<sup>2+</sup>-függő folyamat. Feltehetőleg felszabadult 5-HT visszavétele a periférián is egy specifikus transzporter fehérje (SERT) közvetítésével valósul meg. Sadamoto és mtsai. (2008) in situ hibridizációs módszer segítségével igazolták a *Lymnaea* KIR-ében, hogy az 5-HT-IR és transzporter RNS jelölt neuron eloszlás hasonló.

Fiziológiai-farmakológiai kísérleteink is egyértelműen bizonyítják az 5-HT szerepét a pofaizomzat innervációjában. Bármilyen jellegű, az endogén 5-HT szintet befolyásoló beavatkozás kihatott a reszelőnyelv kitűrésének aktivitására. 5-HTP kezelés megnövelte az 5-HT szintet és ezzel serkentette a reszelőnyelv aktivitását, míg pCPA kezelés, mely blokkolta az 5-HT szintézist, csökkentette a radula kitűrésének gyakoriságát. Azonban amikor a pCPA kezelést az 5-HTP-vel együtt alkalmaztuk, a radula aktivitása ismét emelkedett, azaz az 5-HTP képes volt kivédeni a pCPA blokkoló hatását. Korábbi vizsgálatok során már kimutatták, hogy pCPA kezelés az 5-HT szabályozása alatt álló embrionális forgást is blokkolta mind *Lymnaea*-ban (Filla és mtsai., 2009) mind *Helisoma*-ban (Diefenbach és mtsai., 1995). A *Lymnaea* esetében az 5-HT szerepét az embriogenezis menetének szabályozásában (időtartamában) is kimutatták (Filla és mtsai., 2009); eredményeik nyilvánvalóvá tették, hogy a monoamin szintek (5-HT, dopamin) csökkenése vagy növekedése az embriogenezis késleltetését eredményezi, azaz

bármilyen irányú változás lép fel az embrió endogén 5-HT (és DA) szintjében, az kedvezőtlenül hat az embrió fejlődésére is.

Habár a puhatestűek KIR-ében az 5-HT neurotranszmitter/neuromodulátor szerepe régóta jól ismert (Walker, 1986, S.-Rózsa, 1984; Messenger, 1996), csak a legutóbbi időkben vált egyértelművé, hogy az 5-HT az idegi fejlődés szabályozásában is részt vesz (Buznikov et al., 1999), beleértve a neuronok növekedésére gyakorolt gátló vagy serkentő hatását (Chubakov és mtsai, 1986; Goldberg és Kater, 1989). Ezért a KIR-ben az 5-HT korai megjelenése utalhat egyrészt annak a lárvális idegrendszerben betöltött szerepére, másrészt résztvételre a pofaizomzat (pofarégió) fejlődésének a szabályozásában. Ez utóbbiban kettős szerepe lehet: hathat magának a pofaizomzatnak a fejlődésére, illetve szabályozhatja a táplálkozási aktivitást mind perifériás célszerv (pofaizomzat), mind központi (pofaganglion, motoneuronok) szinten.

Vizsgálataink alapján felmerülhet a kérdés: mi lehet az iniciátora a pofaizomzat késői 5-HT-IR innervációjának? Egyik lehetséges magyarázat az, hogy az 5-HTerg receptorok már korábban, az innervációt megelőzően megjelennek az izomkötegeken, és jelenlétükkel segítik az 5-HTerg nyúlványokat a célsejtek megtalálásában, azaz az ideg-izom kapcsolatok kialakításában (Shepherd, 1988). A másik lehetséges magyarázat, hogy az izomsejtek és az 5-HT-IR idegi elemek között kialakuló kapcsolatokat egyes neurotrofinok és/vagy tirozin-kináz receptorok (Trk) családja szabályozzák, amennyiben ezek elősegítik, támogatják az axonok növekedését, illetve a növekedő axonok útkeresését (pathfinding). A Trk-k a gerinces idegrendszerben multifunkcionális szerepet töltenek be az idegrendszer fejlődése során, csakúgy, mint az axonális regenerációban és a szinaptikus plaszticitásban (Kesteren és mtsai., 1998). Trk receptor családokat puhatestűekben is találtak (Jaaro és mtsai., 2001). Bulloch és munkatársai (2005) Ltrk (*Lymnaea* tirozin-kináz receptor) mRNS-t a juvenilis *Lymnaea* feji régiójában és magában az egész embrióban is detektáltak, valamint megállapították, hogy az Ltrk-nak szerepe van a neuronok növekedésében is. A Trk expressziója a késői embrionális és juvenilis stádiumú csigákban volt a legnagyobb, mely utalhat arra, hogy fontos szerepet játszik a szexuálisan éretlen állat fejlődésében. Ezek az eredmények értelmezhetők a *Lymnaea* pofaizomzatában későn megjelenő 5-HT-IR innerváció vonatkozásában is.

## 6.2. Az ideg-izom kapcsolatok ultrastruktúrája

A pofaizomzatot innerváló 5-HT-IR idegi elemeket kriosztát metszetekben és totálpreparátumokban fénymikroszkópos, valamint lézer konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Eredményeink az 5-HT-IR innerváció összetett rendszerére és a fejlődő pofaizomzatban a késői embriogenezis során kialakuló ideg-izom kapcsolatokra utaltak. Ennek alapján elemeztük az embrio- és posztembriogenezis során a pofaizomzat ultrastruktúrális szerkezetében bekövetkező változásokat, az ideg-izom kapcsolatok általános finomszerkezetét, valamint a pofaizomzatban megjelenő 5-HT-IR ideg-izom kapcsolatokat egyrészt rutin elektronmikroszkópia, másrészt összehasonlító fény- és elektronmikroszkópos immunhisztokémia módszerével.

Nagy és Elekes (2000) a korai embrionális *Lymnaea* fejlődését vizsgálta, melynek során a metamorfózis előtt (E35%, veligera állapot) lévő *Lymnaea* embriókban nem tudtak izomrostokat megfigyelni. Eredményeink szerint a metamorfózis stádiumában jelentek meg az első éretlen izomrostok, melyek előfordulása igen ritka volt. A szórványos izomrostok az embrió ventrális régiójában helyezkedtek el, szabálytalan eloszlásban. Az izomrostok finomszerkezete kezdetleges felépítésű volt, többnyire eltérő érettségre utaló struktúrákat írtak le. Az E80%-os előtti embrionális *Lymnaea*-k pofaizomzatát csak kis számú izomrostok alkották, melyek kevés kontraktilis elemet tartalmaztak. E80%-os embriók pofaizomzatát alkotó izomelemek még fejletlenek, azok többsége magányos formában volt jelen, bár egyes esetekben előfordult kisebb kötegekbe való rendeződésük is. Nagy és Elekes (2000) megfigyelései szerint is ebben a fejlődési stádiumban a még fejlődő izomsejtek szétszórtan helyezkedtek el az osztódó hámsejtek, illetve a még be nem azonosítható pluripotens állapotban levő sejtek között a talp különböző régióiban. Az E90%-E100%-os embriókban a pofaizomzat kontraktilis elemei már fejlett, rendezett szerkezetet mutattak: az izomrostokat nagyszámú, tömött, párhuzamos lefutású miofibrillum töltötte ki. Az embrionális fejlődés végére egy jól szervezett, fejlett ultrastruktúrájú pofarégió alakult ki, mely az ideg-izom kapcsolatok érésével együtt anatómiai és funkcionális alapot nyújt a reszelőnyelv kitüréséhez. A kikelő és a posztembrionális csigák pofaizomzatának ultrastruktúrális képe gyakorlatilag megegyezett az érett, E100%-os csigák pofaizomzatának ultrastruktúrális képével. A posztembrionális fejlődés során az izomrostok mérete tovább nőtt.

Az első ideg-izom kapcsolatok az E80%-os fejlettségű csigák pofaizomzatában jelentek meg, mely jó egyezést mutatott a korábbi kriosztátos metszetekben, illetve totál preparátumokban megfigyelttekkel. E80%-os fejlettség előtt, hasonlóan Nagy és Elekes (2000) által megfigyelttekhez, nem lehetett ideg-izom kapcsolatokat észlelni. E80%-os embriók

pofaizomzatában az ideg-izom kapcsolatok még fejletlenek voltak, az axonprofilok vagy magányos izomelemek mentén vagy az izomrostok között voltak fellelhetők. Nagy és Elekes (2000) megfigyelései szerint is először az E75%-E80%-os fejlettségű embriók perifériás területein jelentek meg axonkötegek. Ezek többnyire az izomrostok közelében helyezkedtek el. A fejlődő *Lymnaea* pofaizomzatában a varikozítások -vezikula és granulum tartalom alapján - különböző ultrastruktúrális képet mutattak. Az axonprofilok főleg szoros (16-20 nm távolságú) membrán kapcsolatokat alakítottak ki az izomsejtekkel, azonban membránspecializációra utaló ultrastruktúrális jelek nélkül, melyeken keresztül feltehetőleg gyors, modulatoros hatást fejtenek ki az izomsejteken. Az ideg-izom kapcsolatok ilyen típusú szerveződése ugyancsak megegyezik a *Lymnaea* embriók más régióiban már korábban leírtakkal (Nagy és Elekes, 2000). Az E90%-os fejlettségi állapottól kezdve a pofaizomzatban az ideg-izom kapcsolatok már rendszeresen megtalálhatóak voltak és számuk a későbbi (E100%) embrionális fejlődés során tovább nőtt. A pofaizomzatban előforduló axonkötegeket gliaelemek határolták körbe, melyek előfordultak a neuromuszkuláris kapcsolatok közvetlen közelében is. Korábban Nagy és Elekes leírták (2000), hogy a gliaelemek megjelenése a periférián hamarabb bekövetkezik az embriogenezis során, mint a KIR-ben.

Izomrostokkal kapcsolatot létesítő 5-HT-IR varikozításokat is csak a késői embrionális stádiumú, E80%-os csigák pofaizomzatában sikerült megfigyelnünk. Az 5-HT immunreaktív elemek főleg szoros, de membránspecializáció mentes kapcsolatokat alakítottak ki, utalva az 5-HT modulatoros hatására. Az FMRFamid- illetve MIP-tartalmú elemek vizsgálata során is egyértelmű volt a szoros, de membránspecializáció mentes immunreaktív kapcsolatok túlsúlya a felnőtt *Helix pomatia* perifériás szöveteiben, köztük a pofaizomzatban is (Elekes és Ude, 1994; Elekes, 2000). Az *Aplysia* anterior radula záró izmában Vilim és munkatársai (1996a, b) ugyanakkor olyan bukkalin- és myomodulin-IR varikozításokat találtak, melyek az izomrostokkal gyengén specializált membránkapcsolatokat hoztak létre. Azok a megfigyeléseink, hogy az 5-HT-IR varikozítások a *Lymnaea* pofaizomzatában az izom elemektől messze (100-200  $\mu$ m) vagy szabadon az extracelluláris térben is megtalálhatóak voltak, valamint hogy a szoros (16-20 nm) 5-HT-IR ideg-izom kapcsolatok is membránspecializáció nélküliek, arra utalnak, hogy a *Lymnaea* pofaizomzatában az 5-HTerg modulatoros szabályozásnak több formája is szerepet játszik. A szignál molekuláknak ezt a nem szinaptikus, volumen transzmissziós szerepét gerincesekben (Vizi, 1984; Vizi és Kiss, 1998; Vizi és mtsai., 2010), ízeltlábúakban (Nässel, 2009) és csigák (*Helix*) perifériás idegrendszerében (Benedeczky és Halasy, 1988) is leírták. Elekes (2000) a peptiderg modulációt vizsgálta *Helix*

különböző perifériás szerveinek (pofaizomzat, szív, nyálmirigy) ideg-izom kapcsolataiban. Megállapította, hogy azok a kapcsolatok, melyek membránspecializáció nélkül az extracelluláris térben szabadon, vagy viszonylag távol helyezkednek el a célsejttől, nem szinaptikus, lassabb modulátoros, „remote” hatást közvetítenek, és a neurohormonális-szerű szabályozásban vesznek részt. Ezekkel a megállapításokkal eredményeink jó összhangban állnak.

Összegezve az 5-HT-IR axonprofilok ideg-izom kapcsolatainak ultrastruktúrája alapján feltételezhető, hogy az 5-HT ezeken a kapcsolatokon keresztül nem szinaptikus, modulátoros úton kettős szerepet tölthet be: (i) az 5-HT lokalizált membránhatás közvetlenül az izomsejteken a szoros (16-20 nm), de specializáció mentes kapcsolatokon át, és (ii) egy lassú volumen transzmissziós hatás a széles (100-200 nm) intercelluláris tereken keresztül érvényesül. Az izomelemekkel és az ideg-izom kapcsolatokkal kapcsolatos eredményeink egyben jól korrelálnak a pofaizomzat és a *Lymnaea* táplálkozási magatartásának fejlődésével. Mint már említettük, Voronezhskaya és mtsai (1999) megfigyelései szerint a felnőtt szerű táplálkozási viselkedésre utaló ritmikus radula mozgás viszonylag későn, a posztmetamorfotikus E80%-os körüli embriókban jelenik meg először.

A puhatestűekben a pofaizomzatot innerváló 5-HT-IR elemek egyetlen forrása az 5-HTerg óriás neuron (CGC), mely a cerebrális ganglionban helyezkedik el (*Lymnaea*, Croll and Chiasson, 1989; MGC, *Helix*, Pentreath and Cottrell 1974). Az 5-HT-nak a *Lymnaea* táplálkozási rendszerében betöltött szerepével részletesen foglalkoztak (Kyriakides és McCrohan, 1989; Tuersley és McCrohan, 1988; Yeoman és mtsai., 1994a; 1996), csakúgy, mint *Aplysia*-ban az 5-HTerg C1-es sejtjének (homológ a CGC-vel) a radula záróizmon kifejtett modulátoros hatásával (Weiss és mtsai., 1978). A CGC 5-HT-IR perifériás elemeinek fejlődését és ultrastruktúrális szerveződését azonban eddig nem írták le. A jelen disszertáció elektronmikroszkópos 5-HT immunhisztokémiai eredményei tekinthetők az elsőnek az irodalomban, mely részletesen ismerteti e neuron végződéseinek ultrastruktúráját a pofaizomzatban. Ugyanakkor a CGC 5-HT-IR pofaizomzatot innerváló axonjainak nyomkövetése a korai embriogenezis során nem volt lehetséges, mivel ekkor sem csak a CGC az egyetlen 5-HT-IR sejt a cerebrális ganglionban. Konfokális mikroszkóppal már E60%-os stádiumban is megfigyelhető egy vékony 5-HT-IR axon a cerebro-bukkális konnektívumban, illetve a bukkális ganglionban, mely feltételezhetően a CGC-ből ered. Yamanaka és mtsai-nak (2000) a korai embriogenezis során (amikor már azonosíthatóvá válik a CGC) sikerült nyomkövetni egy vékony, a CGC-ből kiinduló 5-HT-IR axont, ami a cerebrobukkális konnektívumon keresztül eléri a bukkális gangliont.

A *Lymnaea* pofaizomzat CGC általi szabályozásával kapcsolatban említést érdemel, hogy az feltehetőleg nem önmagában, hanem más hírvívő rendszerek, többek között neuropeptidek hatásával együtt érvényesül. Santama és mtsai (1994) vizsgálták a puhatestűekben előforduló neuropeptidek [(myomodulin, kis kardioaktív neuropeptidek (SCP), buccalin, FMRFamid)] eloszlását a *Lymnaea* központi neuronhálózatában, valamint a táplálkozási rendszer perifériás szöveteiben. Az FMRFamid kivételével sikeresen kimutatták a CGC-ben a myomodulint, buccalint és az SCP-t, míg a pofaizomzatban az összes neuropeptidet sikerült detektálni. Kellett és mtsai (1996) a myomodulin gén expresszióját is kimutatták a *Lymnaea* CGC-ben. A fejlődő pofaizomzat ideg-izom kapcsolataiban a granuláris vezikulák jelenléte összefügghet a neuropeptidek raktározásával. Feltehetően az erős immunprecipitáció miatt, de hasonló granulumokat nem tudtunk megfigyelni az 5-HT-IR varikozitásokban. Régóta általánosan elfogadott tény a neuropeptidek és kis molekulájú neurotranszmitterek neuronális kolokalizációja mind a gerincesekben, mind a gerinctelenekben (Kupfermann, 1991). Kiss és mtsai (2010) megfigyelték, hogy a *Helix pomatia* nyálmirigy vezetékét inerváló 5-HT-IR elemek különböző neuropeptideket (FMRFa, CARP, MIP) is tartalmaznak.

### **6.3. A pofaizomzat szerotonerg szabályozásáért felelős receptorok azonosítása**

A puhatestűek, de lényegében az összes gerinctelen esetében a gerincesekhez képest nagyon kevés adattal rendelkezünk az 5-HT receptorokról. Az elmúlt évtizedek kutatásai során fedezték fel a gerincesek 5-HT receptor családjainak újabb és újabb tagjait, ami elengedhetlenné tette osztályozásukat. Habár a gerinctelenek 5-HT receptorainak fiziológiai és farmakológiai vizsgálata párhuzamosan folyt és jelenleg is folyik a gerinces kutatásokkal, a mai napig hiányzik a gerinctelen 5-HT receptorok jól definiált osztályozási rendszere. Amikor az 5-HT receptorokat a gerinctelenekben próbáljuk osztályozni és azonosítani, figyelembe kell venni azt a tényt is, hogy az endogen receptorokat gyakran az emlős 5-HT receptorok szerint osztályozzák, annak ellenére, hogy sok esetben a gerinces és a gerinctelen 5-HT receptorok farmakológiai tulajdonságaikban szignifikánsan különböznek egymástól (Goldberg és mtsai., 1994; Walker és mtsai, 1996; Tierney, 2001). Ezért hangsúlyozzuk, hogy amikor az 5-HT receptorokkal kapcsolatos eredményeinket értelmezzük, azt a legnagyobb óvatossággal tesszük.

A pofaizomzatban jelenlevő és a reszelőnyelv kitűrésében részt vevő 5-HT receptorokat mind biokémiai, mind *in vivo* farmakológiai-fiziológiai kísérletekkel megpróbáltuk azonosítani. Biokémiai vizsgálatainkban a receptorok kinetikai paramétereinek meghatározásához a

receptorkötést különböző koncentrációjú [ $^3\text{H}$ ]-5-HT-val elemeztük, valamint farmakológia profiljukat cAMP kísérletekkel jellemeztük. Eredményeink szerint a pofaizomzatban az 5-HT receptor pozitívan kapcsolt az AC rendszerhez, mivel az 5-HT stimulálta az AC aktivitását. Ez arra utal, hogy a *Lymnaea* pofaizomzatban jelen levő 5-HT receptor a gerincesekben azonosított 5-HT<sub>6</sub> típusú receptorral hasonló (7. ábra) (Glennon és mtsai., 2000; Hoyer és mtsai., 2002). Ezt támasztja alá, hogy az 5-HT, illetve agonsitái (5-CT, 5-metoxitryptamin, 8-OH-DPAT) a szöveti cAMP koncentrációt megemelték, vagyis serkentőleg hatottak az AC aktivitásra, illetve hogy azt az 5-HT antagonisíták vagy antidepresszánsok (SB252585, clozapin, clomipramin és doxepin) sikeresen csökkentették. Az alkalmazott 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonisták sikeresen gátolták a jelzett 5-HT kötődését, tehát az 5-HT<sub>6</sub> típusú receptor létét a membrán preparátumhoz való kötődési kísérleteink is megerősítették. A koncentrációfüggő 5-HT kötődés nagy affinitású, telítési görbével jellemezhető és csak egyetlen kötőhely jelenléte valószínűsíthető. Ezzel szemben *Helix* (Drummond és mtsai., 1980) és *Aplysia* KIR-ében (Kadan és Hartig, 1988) nem tudták kimutatni az 5-HT nagy affinitású kötődését, illetve korábbi biokémiai vizsgálatok szerint a felnőtt *Lymnaea* idegrendszerében sem az 5-HT sem az ismert 5-HT<sub>1-3</sub>, illetve 5-HT<sub>5-7</sub> receptor ligandok nem kötődtek nagy affinitással (Hiripi és Elekes, nem publikált). Mindkét faj KIR-ében csak az [ $^3\text{H}$ ]-LSD mutatott nagy affinitású kötődést, és a kötődés farmakológiai tulajdonsága is hasonló volt. Nehezíti a receptor jellemzését az a tény is, hogy [ $^3\text{H}$ ]-LSD nemcsak az 5-HT, hanem a DA receptorhoz is kötődik a puhatestűek idegrendszerében és az LSD kötődés gátlását akár az 5-HT, akár a DA receptorhoz hatásosan csak ergot alkaloidák és neuroleptikumok gátolják, a receptor altípusok szelektív agonistái vagy antagonistái nem, így szinte lehetetlen a receptor pontos osztályozása. A leszorításos kísérletekből az is kiderült, hogy az 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonisták gátolták a legjobban az 5-HT kötődését, ami szintén az 5-HT<sub>6</sub> receptor jelenlétére utal. Walcourt-Ambakederma és Winlow (1994a, b; 1995) három endogén 5-HT receptor típust, az 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> és 5-HT<sub>3</sub>-t azonosították sejt kultúrában nevelt *Lymnaea* neuronokon. Azonban kísérleteikben csak kisszámú és nem szelektív agonistákat és antagonistákat használtak, valamint a hatásos koncentrációk (mM) túl magasak voltak ahhoz, hogy a hatásukat specifikusnak tekinthessük.

Az *in vivo* farmakológiai-fiziológiai kísérleteink is megerősítették, hogy az 5-HT<sub>6</sub> receptor szerepet játszik a táplálkozásban. Az 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonista clomipramin számottevően csökkentette, míg a metergolin, mely egy 5-HT<sub>6,7</sub> receptor agonista és 5-HT<sub>1</sub> receptor antagonista növelte a radula aktivitását. Farmakológiai-fiziológiai kísérleteink eredményei ugyanakkor valószínűsítik, hogy az 5-HT<sub>6</sub> receptor mellett más receptor típusok is



részt vesznek a táplálkozás szabályozásában. Az a tény, hogy az 5-CT (5-HT<sub>1,5,7</sub> receptor agonista) és az indorenat (5-HT<sub>1,2</sub> receptor agonista) jelentősen csökkentette a radula kitűrések számát, arra enged következtetni, hogy az 5-HT<sub>1</sub> receptor is, mely negatívan kapcsolt az AC-hoz, részt vesz a reszelőnyelv kitűrésének szabályozásában. Tehát a táplálkozási aktivitás (reszelőnyelv kitűrés) 5-HTerg szabályozásában az 5-HT<sub>1</sub> receptoron keresztül egy gátló, míg az 5-HT<sub>6,7</sub> receptorokon keresztül egy serkentő útvonal valósul meg (7. ábra). Ezt támasztja alá a kombinált S-WAY 100135 (5-HT<sub>1</sub> receptor antagonista) és metergolin kezelés is, mely egyszerre blokkolja az 5-HT<sub>1</sub> receptort és serkenti az 5-HT<sub>6,7</sub> receptorokat, melynek során erőteljes (200%-os) növekedést tapasztaltunk a reszelőnyelv kitűrésben.

Összehasonlítva a biokémiai és farmakológiai-fiziológiai vizsgálataink eredményeit, megállapítható, hogy azok csak részben korrelálnak egymással. A biokémiai vizsgálatokkal az 5-HT<sub>6</sub> receptor jelenlétét sikerült kimutatni, míg a farmakológiai-fiziológiai vizsgálatok emellett az 5-HT<sub>1</sub> és 5-HT<sub>7</sub> receptorok szerepére is utalnak. Ez a különbség azonban adódhat abból is, hogy az előbbi kísérleteket pofaizomzat preparátumokon, míg az utóbbi vizsgálatainkat *in vivo* csiga embriókon végeztük. Goldberg és munkatársai (1994) *Helisoma* embrióban egy 5-HT<sub>1</sub> típusú receptor jelenlétét feltételezték. Kísérleti eredményeik azonban csak részben támasztották ezt alá, ugyanis a 8-OH-DPAT serkentő hatása csak mérsékelt volt, valamint az 5-HT receptor és a másodlagos hírvivő rendszer között kapcsolatot nem tudtak kimutatni. Szintén *Helisoma*-ban Mapara és mtsai. (2008) az embriók forgó mozgását vizsgálva megállapították hogy azt az 5-HT az 5-HT<sub>1</sub> és az 5-HT<sub>7</sub> receptorokon keresztül szabályozza. Jelenlétüket kimutatták a talp csillós hám sejteiben is, melyek felelősek a forgómozgás kivitelezéséért. *Lymnaea* embriókban is bizonyították, hogy a korai embrionális forgómozgás szabályozásában az 5-HT<sub>1A</sub> receptor vesz részt (Hiripi és Elekes, 2010).

Felnőtt puhatestűekben öt 5-HT receptor gént klónoztak: kettőt *Lymnaea stagnalis*-ban (Sugamori és mtsai., 1993; Gerhardt és mtsai., 1996) és hármat *Aplysia californica*-ban (Li 1995, Angers és mtsai., 1998). A *Lymnaea stagnalis*-ban klónozott 5-HT<sub>Lym1</sub> receptor 509 aminosav hosszú volt, és a legnagyobb homológiát a *Drosophila* és az emlős 5-HT<sub>1</sub> receptorával mutatta. Farmakológiai jellemzése után azonban az eredmények nem voltak egyértelműek, a receptor csak részben, a receptor gén strukturális hasonlóságában, mutatott egyezést az emlős 5-HT<sub>1</sub> receptor farmakológiai profiljával. A felnőtt *Lymnaea*-ban vizsgált endogén (Hiripi és Elekes, nem publikált) és a klónozott receptor tulajdonsága között hasonlóság volt, hogy mindkét receptor nagy affinitással kötötte az [<sup>3</sup>H]-LSD-t, valamint az 5-HT<sub>1</sub> receptorra szelektív 5-HT, 5-CT, 8-OH-DPAT affinitása mindkét receptorhoz alacsony volt. Filla és mtsai (2009) vizsgálatai

szerint azonban az endogén receptor pozitívan kapcsolt az AC rendszerhez, míg a klónozott receptorról feltételezik, hogy az negatívan kapcsolt (Sugamori és mtsai, 1993; Tierney, 2001). Az 5-HT<sub>Lym1</sub> receptor a KIR-ben és a szívben volt jelen.

A másik 5-HT receptort *Lymnaea*-ban Gerhardt és munkatársai (1996) klónozták. Funkció és szerkezeti tulajdonságai alapján a gerinces 5-HT<sub>2</sub> típusú receptorként jellemezték, ezért 5-HT<sub>Lym2</sub> receptornak nevezték el. HEK293-as sejtekben expresszáltatták és 5-HT stimuláció hatására nőtt a szöveti inozitól foszfátáz koncentrációja, hasonlóan a gerinces 5-HT<sub>2</sub> receptorhoz, azaz elmondható, hogy az 5-HT<sub>Lym2</sub> receptor a foszfolipáz C-t aktiválja. Hibridizációs vizsgálatok kimutatták, hogy a receptor csak nagyon kevés idegsejben expresszáldik, szemben a ganglionok gazdag 5-HTerg innervációjával (Kemenes és mtsai., 1989). Az 5-HT<sub>Lym2</sub> receptor elsősorban a periférián, mint például a szívben, nyelőcsőben, nyálmirigyben és a spermavezetékben van jelen.

Li és mtsai. (1995) *Aplysia californica*-ban két, egymáshoz tulajdonságaikban nagyon hasonló 5-HT receptort klónoztak. Ezek az Ap5-HT<sub>B1</sub> és az Ap5-HT<sub>B2</sub> receptorok voltak. HEK293-as sejtekben expresszáltatták őket és koncentráció függően, 5-HT hatására nőtt a szöveti inozitol foszfátáz, mely a foszfolipáz C aktiválódása következtében történt. Az Ap5-HT<sub>B1</sub> receptor a reproduktív szervekben, míg az Ap5-HT<sub>B2</sub> receptor a KIR-ben expresszáldik. A harmadik 5-HT receptort (5-HT<sub>1ap</sub> receptor) *Aplysia* perifériás szövetéből klónozták Angers és mtsai (1998). Megállapították, hogy az 5-HT<sub>1ap</sub> receptor negatívan kapcsolt a másodlagos hírvivő rendszerhez. A ligand kötés vizsgálatok során azonban csak [<sup>3</sup>H]-LSD-t használtak ligandként, és a leszorításos vizsgálatok azt mutatták, hogy a 8-OH-DPAT affinitása mérsékelt, míg az 5-CT affinitása nagy. Arra, hogy ez a receptor sem teljes mértékben egyezik a gerinces 5-HT<sub>1</sub> receptorral az 5-HT<sub>1ap</sub> elnevezéssel is utaltak.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a biokémiai és farmakológiai-fiziológiai vizsgálataink eredményei jól kiegészítik egymást és arra utalnak, hogy a táplálkozási aktivitás (reszelőnyelv kitérés) 5-HTerg szabályozásában feltehetőleg három különböző 5-HT receptor típus, a gátló 5-HT<sub>1</sub>-, és a serkentő 5-HT<sub>6,7</sub> receptorok vesznek részt.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A táplálkozás központi szerotonerg (5-HTerg) szabályozásának mechanizmusáról széles körű ismeretanyag áll rendelkezésünkre csigákban (Gastropoda, Mollusca), ugyanakkor nagyon kevés adatot ismerünk a perifériás eseményekkel kapcsolatban, a táplálkozásban részt vevő izmok szabályozásának morfológiai és fiziológiai hátteréről, és azok embrionális és posztembrionális fejlődés alatt bekövetkező változásairól. Az sem tisztázott, hogy a pofaizomzat 5-HTerg szabályozása mögött milyen biokémiai és jelfelfogó (receptor) elemek állnak. Munkánk során ezért az embrionális, juvenilis és felnőtt nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) pofaizomzatában szövettani, fény - és elektronmikroszkópos immunhisztokémiai, biokémiai és fiziológiai-farmakológiai módszerekkel vizsgáltuk az 5-HTerg innerváció fejlődését, neurokémiai jellemzőit, valamint megkíséreltük a táplálkozásban résztvevő 5-HTerg receptorok azonosítását.

Új eredményeinket az alábbiakban foglaljuk össze:

1. Leírtuk az 5-HT-IR idegelemek térbeli és időbeli elrendeződését a pofaizomzatban az embriogenezis és posztembriogenezis során. Eredményeink szerint a pofaizomzatban az 5-HT-IR innerváció egy folyamatos, és viszonylag gyors fejlődéssel jellemezhető, melynek során a késői (E80%) embriogenezistől kezdődően a korai posztembriogenezisig (P1, P2) az 5-HTerg rendszer végső mintázata kialakul. A korai posztembrionális (P2, P3) csigák 5-HT-IR innervációs mintázata a kifejlett felnőtt csigákéra emlékeztet és ez egybeesik a teljes pofaizomzat anatómiai és funkcionális érésével.
2. A késői embrionális fejlődés során a hosszanti és körkörös izomkötegekből felépülő pofaizomzatban is óriási méretbeli és szerkezeti változás zajlik le. Vizsgáltuk a fejlődő pofaizomzat ultrastruktúráját és megállapítottuk, hogy míg az E80%-os embrió pofaizomzata fejletlen, kevés izomköteg építi fel, addig a vékony, egy-két rétegű izom az embrionális fejlődés végére többretegű, fejlett kontraktilis apparátussal rendelkező izomzattá alakul át, mely már képes az aktív táplálkozás

(radula mozgatás) kivitelezésére. A poszttembrionogenezis során a pofaizomzat további méretbeli növekedésen megy keresztül .

3. Az ideg-izom kapcsolatokat ultrastrukturális szinten elsőként E80%-os fejlettségű embriók pofaizomzatában találtunk. Ezek az axon terminálisok/varikozitások többségükben szoros (16-20 nm) membránspecializáció nélküli kapcsolatot létesítettek az izomrostokkal. Az 5-HT-IR jelölt axonvégződéses/varikozitások ugyancsak membránspecializáció nélkül kapcsolódtak az izomrostokhoz. A fejlődő (embrionális és posztembrionális) és a kifejlett csigák pofaizomzatának varikozitásaiban három féle kapcsolat típust találtunk. Széles (100-200 nm), illetve többségében szoros (16-20 nm), specializáció mentes membránkapcsolatok mellett a varikózus axonok egy további csoportja szabadon az izomrostoktól nagy távolságban (0.5-1  $\mu$ m) futott az extracelluláris térben. Mindezek alapján az 5-HT kétféle szerepe tételezhető fel az ideg-izom kapcsolatokban. A szoros, specializációmentes kapcsolatokon keresztül gyorsabb hatással, míg a célsejtektől távolabb elhelyezkedő idegelemekeken keresztül egy lassabb, modulátoros illetve neurohormonális hatást fejt ki.
4. A biokémiai eredményeink jó összhangban állnak az 5-HTerg rendszerrel kapcsolatos kémiai-neuroanatómiai megfigyeléseinkkel. A fejlődő juvenilis *Lymnaea* pofaizomzatában folyamatosan nő az 5-HT koncentráció. A pofaizomzatban egy aktív 5-HTerg neurotranszmisszió jelenlétére utal, hogy az egy specifikus 5-HT felvevő-leadó rendszerrel és egy, nagy affinitású kötőhellyel rendelkezik.
5. Biokémiai és fiziológiai-farmakológiai vizsgálatainkkal bizonyítottuk, hogy a reszelőnyelv mozgatásának 5-HTerg szabályozásában egy gátló 5-HT<sub>1</sub> típusú- és két serkentő 5-HT<sub>6,7</sub> típusú receptor vesz részt.
6. Eredményeink arra utalnak, hogy az 5-HT neurotranszmitter/modulátor szerepet tölt be a fejlődő mocsári csiga táplálkozását, mint végrehajtó szerv, biztosító pofaizomzat szabályozásában, de egyben irányíthatja annak funkcionális érését is. Eredményeink egyben hiánypótlónak tekinthetők, melynek során elsőként írtuk le multidiszciplináris megközelítéssel az 5-HTerg rendszer periférián bekövetkező fejlődését, és így azok hozzájárulhatnak az 5-HT szerepének pontosabb tisztázásához a táplálkozási magatartás szabályozásában.

## 8. SUMMARY

The central serotonergic (5-HTergic) regulation of the feeding system is well known in snails (Gastropod, Molluscs). However, much less attention has been paid to the peripheral targets of the central elements, including the morphological and physiological background of the modulation of muscle function during the embryo- and postembryogenesis. We still have little information about the biochemical processes underlying the 5-HTergic control in the buccal mass, as well as the 5-HTergic receptors involved have not yet been identified either. Therefore, the aim of the present thesis was to obtain a detailed insight into development of the 5-HTergic innervation of peripheral feeding (buccal mass) system of the developing (embryonic and juvenile) and adult pond snail, *Lymnaea stagnalis*, and to characterize the 5-HT receptors. For this reason the combination of light- and electronmicroscopic 5-HT immunohistochemistry, as well as biochemical and physiological techniques were used.

Our new results can be summarized as follows:

1. We described the spatial and temporal organization of the 5-HT-IR elements in the buccal mass during the embryo- and postembryogenesis. According to our results, the 5-HT-IR innervation is characterized by a continuous and relative fast maturation. The final 5-HTergic system starts to be organized the late embryogenesis (E80%) and lasts until the early postembryogenesis (P1, P2). The 5-HT-IR innervation pattern seen in postembryogenic (P2, P3) snails resembles that found in adult snails.
2. In the course of late embryogenesis the longitudinal and circular muscle fibers of the buccal mass show a significant change from both the point of size and organization. We also investigated the ultrastructure of the buccal mass. The buccal mass in E80% embryos is characterized by a few immature muscle fibers. By the end of embryogenesis these fibers form a complex multilayered buccal musculature with mature contractile apparatus, capable of carrying out active feeding (radula movement). The size of the buccal mass continuously increases during postembryogenesis.

3. At ultrastructural level, the first neuromuscular contacts were found in the buccal mass of E80% embryos. Close (16-20 nm) but mostly unspecialized neuromuscular contacts were formed by both unlabeled and 5-HTLIR axon profiles. Three types of neuromuscular contacts were found in the buccal mass of developing and adult snails. Wide (100-200 nm) and mostly close (16-20 nm) unspecialized neuromuscular contacts, as well labeled axon processes located relative far from the muscle cells in the extracellular space were found. According to these ultrastructural findings it is suggested that 5-HT plays a modulatory role in the neuromuscular contacts in different ways. It has a fast modulatory role via close, unspecialized membrane contacts, and a slow modulatory role via the wide contacts. In addition, a neurohormonal effect can be attributed to 5-HT via the endings located far from the muscle cells in the extracellular space.
4. The biochemical data correlate well with the data obtained by 5-HT immunohistochemistry. HPLC assay showed a gradual increase of the 5-HT level in the buccal mass during development. According to our biochemical results the 5-HTergic neurotransmission possesses a single component high affinity 5-HT uptake system, coupled with a  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^+$  dependent release.
5. Our biochemical and pharmacological-physiological experiments refer to the presence of three types of 5-HT receptors in the buccal muscle. The inhibitory 5-HT<sub>1</sub>-like and the stimulatory 5-HT<sub>6,7</sub>-like receptors seem to be involved in the 5-HTergic regulation of feeding activity (radula protraction).
6. Taken as a whole, 5-HT is suggested to play a wide neurotransmitter/modulatory role in the buccal mass (peripheral feeding system) of the developing pond snail and it may also play a role in the functional maturation of the muscle system. Our results provide new data contributing to the better understanding and interpretation of the 5-HTergic regulation of the feeding behavior of gastropod mollusks.

## 9. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

### 9.1. A disszertáció alapjául szolgáló publikációk:

Balog G., Elekes K. (2008): Functional neuroanatomy of the 5-HTergic system in the developing and adult buccal complex of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*.  
Acta Biologica Hungarica, 59, 55-59. IF: 0,447

Balog G., Voronezhskaya E. E., Hiripi L., Elekes K. (2011): Organization of the serotonergic innervation of the feeding (buccal) musculature during the maturation of the pond snail *Lymnaea stagnalis*: a morphological and biochemical study  
Journal of Comparative Neurology, DOI 10.1002/cne.22693, IF: 3.741

Balog G., Voronezhskaya E. E., Hiripi L., Elekes K. (2011): Biochemical and pharmacological characteristics of the serotonergic innervation of the buccal muscle in the pond snail, *Lymnaea stagnalis* (kézirat előkészületben)

### 9.2. A disszertációhoz kapcsolódó konferencia előadások, poszterek:

Balog G., Elekes K. (2007). Chemical-neuroanatomy of the 5-HTergic system in the buccal complex of the snail (*Helix* and *Lymnaea*). 11th Meeting Hung. Neurosci. Soc., Szeged, (poszter) Abstract: Clin. Neurosci. 2007;60 (S1):1-72.

Balog G., Elekes K. (2007). Organization of the serotonergic system in the buccal region of pulmonate gastropods, *Lymnaea* and *Helix*. 31st Neurobiol. Conf. Göttingen, (poszter) Abstract: Neurowissenschaftliche Gesellschaft e.V. p.142. Neuroforum Suppl. Februar 2007 (1). ISSN 0947-0875.

Balog G., Elekes K. (2007). Functional neuroanatomy of the 5HTergic system in the developing and adult buccal complex of gastropods (*Helix* and *Lymnaea*). 11th Symp. Invertebr. Neurobiol.,Tihany. (poszter)

Balog G., Filla A, Hiripi L, Elekes K. (2008). Development of the 5-HTergic innervation of the buccal complex of *Lymnaea*. Immunocytochemical and biochemical characterization. PENS-HERTIE Winterschool 2008, Obergurgl, Austria. (poszter)



- Filla A, Balog G, Hiripi L, Elekes K. (2008). Biochemical and immunohistochemical characterization of the 5-HTergic system in the buccal mass of the developing and adult pond snail, *Lymnaea stagnalis*. IBRO Inter. Workshop 2008, Debrecen, (poszter) Abstract: Clin. Neurosci. 61(S1) p.27.
- Balog G, Filla A, Hiripi L, Elekes K. (2008). 5-HT is a transmitter candidate in the peripheral feeding system of an invertebrate, *Lymnaea*. Chemical-neuroanatomical and biochemical evidences. 6th Forum Europ. Neurosci., Genf, (poszter) Abstract:180.3
- Balog G, Voronezhskaya E, Elekes K. (2009). High resolution confocal microscopy of serotonergic innervation of the feeding system in developing *Lymnaea stagnalis*, 12nd Meeting Hung. Neurosci. Soc., Budapest. (poszter), Abstract: Frontiers in Systems Neurosci., DOI: 10.3039/conf.neuro.01.2009.04.074
- Balog G, Filla A, Voronezhskaya E, Hiripi L, Elekes K. (2009). Serotonergic (5-HTergic) innervation of the buccal complex in the developing *Lymnaea stagnalis*. Molluscan Neurosci. Meeting, San Juan, Puerto Rico, (poszter)
- Balog G, Hiripi L, Voronezhskaya E, Elekes K. (2009). Serotonergic regulation of the buccal muscle in *Lymnaea stagnalis*, 9th Conf. of East Europ. Inverteb. Neurosci. Szentpétervár, Oroszország, (poszter)
- Elekes K, Balog G, Kiss T, Hernádi L, Voronezhskaya, E. E., Dobolyi Á, Palkovits M, Hiripi L.: Innervation principles of the peripheral feeding system in gastropods: aminergic and peptidergic modulation. Neuroscience (2009) 39th Annual Meeting of SfN, Chicago (poszter) Abstract: 316.11.
- Balog G, Hiripi L, Elena E. Voronezhskaya, Elekes K. (2010). A light- and electronmicroscopic immunocytochemical, and pharmacological characterization of the developing 5-HTergic system in the buccal mass of *Lymnaea stagnalis* IBRO, International Workshop, Budapest (poszter) Abstract: doi: 10.3389/Conf.fnins.2010.0001

### 9.3. Egyéb konferencia előadások

- Elekes K, Kononenko NL, Balog G, Kiss T. (2007): Ultrastructural organization of the statocyst hair cells of *Lymnaea*. 11th Symp. Invertebr. Neurobiol. Tihany, (poszter)

## 10. IDÉZETT IRODALOM

- Abrams JK, Johnson P, Hay-Schmidt A, Mikkelsen D, Shekhar A, Lowry C (2005) Serotonergic systems associated with arousal and vigilance behaviors following administration of anxiogenic drugs. *Neuroscience* 133:983-997.
- Aghajanian GK, Sprouse JS, Rasmussen K (1987) Physiology of the midbrain serotonin system. *Psychopharmacology: The third generation of progress*. Raven Press, New York. 141-150.
- Aghajanian GK, Sanders-Bush E (2002) Serotonin Neuropsychopharmacology: The fifth generation of progress. Lippincott Williams and Wilkins, 15-34.
- Alvarez MC, Del Castillo J, Sanchez V (1969) Pharmacological responses of the dorsal longitudinal muscle of *Sabellastarte magnifica*. *Comp Biochem Physiol* 29:931-942.
- Andersson M, Fänge R (1967) Pharmacologic receptors of an annelid (*Lumbricus terrestris*). *Arch Int Physiol Biochim* 75:461-468.
- Angers A, Storozhuk MV, Duchaine T, Castellucci VF, DesGroseillers L (1998) Cloning and functional expression of an *Aplysia* 5-HT receptor negatively coupled to adenylate cyclase. *J Neurosci* 18:5586–5593.
- Amin AH, Crawford BB, Gaddum JH (1954) Distribution of 5-hydroxytryptamine and substance P in central nervous system. *J Physiol Lond* 126:596-618.
- Audesirk G, McCaman RE, Willows AOD (1979) The role of serotonin in the control of pedal ciliary activity by identified neurons in *Tritonia diomedea*. *Comp Biochem Physiol. C* 62:87-91.
- Balog G, Elekes K (2008) Functional neuroanatomy of the 5-HTergic system in the developing and adult buccal complex of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Acta Biol Hung* 59: (Suppl) 55-59.
- Bailey CH, Kandel ER (1993) Structural changes accompanying memory storage annual review of physiology. 55: 397-426

- Baines RA, Tyrer MN, Mason JC (1989) The innervation of locust salivary glands. *J Comp Physiol* 165:395-405.
- Barnes NM, Sharp T (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38: 1083-1152.
- Benedeczky I, Halasy K (1988) Visualization of non-synaptic release sites in the myenteric plexus of the snail *Helix pomatia*. *Neuroscience* 25:163-170.
- Benjamin PR, Elliot CJH (1989) Snail feeding Oscillator: the central pattern generator and its control by modulatory interneurons. In: Jacklet J. (ed.). *Neuronal and Cellular Oscillators*. New York: Marcel Dekker.
- Beltz SB, Kravitz EA (1983) Mapping of serotonin-like immunoreactivity in the lobster nervous system. *J Neurosci* 3: 585-602.
- Bloom FE, Cooper J, Roth HR (1991) *The biochemical basis of neuropharmacology*. Oxford University Press, New York
- Blundell JE (1979) Hunger, appetite and satiety constructs in search of identities. In *Nutrition and Lifestyles*, pp. 21-42 M Turner, editor. London: Applied Science Publishers
- Bray GA, Bouchard C (2008) *Handbook of obesity: clinical applications*. Informa Health Care
- Buckett KJ, Peters M, Benjamin PR (1990b) Excitation and inhibition of the heart of the snail, *Lymnaea*, by non-FMRFamidergic motoneurons. *J Neurophysiol* 63:1436-1447
- Bulloch AGM, Diep CQ, Logan CC, Bulloch ES, Robbins SM, Hislop J, Sossin W (2005) LTRK is differentially expressed in developing and adult neurons of the *Lymnaea* central nervous system. *J Comp Neurol* 487:240-254.
- Burrell BD, Sahley CL, Muller KJ (2001) Non-associative learning and serotonin induce similar bi-directional changes in excitability of a neuron critical for learning in the medicinal leech. *J Neurosci* 21:1401-1412.
- Burrell BD, Sahley CL (2005) Serotonin mediates learning-induced potentiation of excitability. *J Neurophysiol* 94:4002-4010.

- Buznikov GA, Shmukler B, Yu, Lauder JM. (1999) Changes in the physiological roles of neurotransmitters during individual development. *Neurosci Behav Physiol* 29:11–21.
- Byrne JH, Baxter DA, Buonomano DV, Cleary LJ, Eskin A, Goldsmith JR, McClendon E, Nazif FA, Noel F, Scholz KP (1991) Neural and molecular bases of nonassociative and associative learning in *Aplysia*. *Annu NY Acad Sci* 627:124-149.
- Cann-Moisan C, Nicolas L és Robert R (2002) Ontogenic changes in the contents of dopamine, norepinephrine and serotonin in larvae and postlarvae of the bivalve *Pecten maximus*. *Aquat Living Resour* 15: 313–318.
- Cazalets JR, Sqalli-Houssaini Y, Clarac F (1992) Activation of the central pattern generators for locomotion by serotonin and excitatory acids in neonatal rat, *J Physiol* 455:187–204.
- Chase R (2002) Behavior and its neuronal control in gastropod molluscs. Oxford University Press, New York
- Chubakov AR, Gromova EA, Konovalov GV, Sarkisova EF, Chumasov EI. (1986) The effects of serotonin on the morpho-functional development of rat cerebral neocortex in tissue culture. *Brain Res* 369:285–297.
- Colas JF, Launay JM, Kellermann O, Rosay P, Maroteaux L (1995) *Drosophila* 5-HT-2 serotonin receptor: Coexpression with fushi-tarazu during segmentation. *Proc, USA* 92:5441-5.
- Cook IM (1966) The sites of action of pericardial organ extract and 5-hydroxytryptamine in the decapods crustacean heart. *Am Zool* 6:107-121.
- Cottrell GA, Greenberg MJ, Price DA (1983) Differential effects of the molluscan neuropeptide FMRFamide and related met-enkephalin derivative YGGFMRFamide on the *Helix* tentacle retractor muscle. *Comp Biochem Physiol* 75C:373-5.
- Croll RP, Chiasson BJ (1989) Postembryonic development of serotoninlike immunoreactivity in the central nervous system of the snail, *Lymnaea stagnalis*. *J Comp Neurol* 280:122–142.
- Croll RP (1987) Distribution of monoamines in the central nervous system of the nudibranch gastropod, *Hermessinda crassicornis*. *Brain Res* 405: 337-347.

- Csoknya M, Takács B, Koza A, Dénes V, Hiripi L, Kaslin J, Elekes K, (2005) Neurochemical characterization of nervous elements innervating the body wall of earthworms (*Lumbricus*, *Eisenia*). Immunocytochemical and pharmacological studies. Cell Tissue Res 321:479-490.
- Cuttle MF, Hevers W, Langhlin SB, Hardie RC (1995) Diurnal modulation of photoreceptor potassium conductance in the locust. J Comp Physiol A 176:307-316.
- Dahlström A, Fuxe K (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. Acta Physiol Scand 232:1–55.
- Davis NT (1987) Serotonin-immunoreactive visceral nerves and neurohemal system of the cockroach *Periplaneta americana* (L.). Cell Tissue Res 240:593-600.
- Davis NT (1987) Neurosecretory neurons and their projections to the serotonin neurohemal system of the cockroach *Periplaneta americana* (L.), and identification of mandibular and maxillary motor neurons associated with this system. J Comp Neurol 259:604-621.
- Diefenbach TJ, Sloley SD, Goldberg JI. (1995) Neurite branch development of an identified serotonergic neuron from embryonic *Helisoma*: evidence for autoregulation by serotonin. Dev Biol 167:282-293.
- Drummond HA, Bucher F és Levitan IB (1980) d-[3H]Lysergic acid diethylamide binding to serotonin receptors in the molluscan nervous system J Biol Chem 255:6679-6686
- Elekes K (1991) Serotonin-immunoreactive varicosities in the cell body region and neural sheath of the snail, *Helix pomatia*, ganglia: an electron microscopic immunocytochemical study. Neurosci 42:583-591.
- Elekes K (2000) Ultrastructural aspects of peptidergic modulation in the peripheral nervous system of *Helix pomatia*. Microsc Res Tech 49:534-546.
- Elekes K, Huster R, Gettard M (1987) Serotonin-immunoreactive and dopamine-immunoreactive neurones in the terminal ganglion of the cricket, *Acheta domestica*: Light- and electron-microscopic immunohistochemistry. Cell Tissue Res 250:167-180.

- Elekes K, Ude J. (1994) Peripheral connections of FMRFamide-immunoreactive neurons in the snail *Helix pomatia*. An immunogold electron microscopic study. *J Neurocytology* 23:758-769.
- Elekes K, Hustert R (1988) The efferent innervation of the genital chamber by an identified serotonergic neuron in the female cricket *Acheta domestica*. *Cell Tissue Res* 252:449-457.
- Elliot CJH, Susswein AJ (2002) Comparative neuroethology of feeding control in molluscs. *J Exp Biol* 205:877-896.
- Erspamer V, Ghirelli F (1951) The action of enteramine on the heart of molluscs. *J Physiol* 115(4):470-481.
- Erspamer V, Asero B (1952) Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature* 169:800-801.
- Falck B, Hillarp NA, Thieme G, Torp A (1961) Fluorescence of catechol amines and related compounds condensed with formaldehyde. *Brain Research* 9, pp. xi-xv.
- Falck B, Owman C (1965) A detailed methodical description of fluorescence method for the cellular demonstration of biogenic monoamines. *Acta Univ Lund*, II/7, 1-24.
- Fickbohm DJ, Lynn-Bullock CP, Spitzer N, Caldwell HK, Katz PS (2001) Localization and quantification of 5-Hydroxytryptophan and serotonin in the central nervous system of *Tritonia* and *Aplysia*. *J Comp Neurol* 437:91-105.
- Filla A, Hiripi L, Elekes K. (2009) Role of aminergic (serotonin and dopamine) systems in the embryogenesis and different embryonic behaviours of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Comp Biochem Physiol Part C* 149:73-82.
- Florey E (1954) An inhibitory and an excitatory factor of mammalian central nervous system, and their action on a single sensory neuron. *Arch Int Physiol* 62:33-53.
- Florey E, Rathmayer M (1978) The effects of octopamine and other amines on the heart and on the neuromuscular transmission in decapod crustaceans: further evidence for a role as neurohormone. *Comp Biochem Physiol* 61C:229-237.
- Folk GE Jr, Mora F (2003) Serotonin and the last great bioassay. *J Biol. Sci.* 3 (10):951-960.

- Fritzsche B, Nikundiwe AM, Will U (1984) Projection patterns of lateral line afferents in *Anurans*: A comparative HRP study. *J Comp Neurol* 229:451-469.
- Gaddum JH, Hameed KA (1954) Drugs which antagonise 5-hydroxytryptamine. *Br. J Pharmacol* 9:240-248.
- Gardner CR, Walker RJ (1982) The roles of putative neurotransmitters and neuromodulators in annelids and related invertebrates. *Prog Neurobiol* 18:81-120.
- Gerhardt CC, Leysen JE, Planta RJ, Vreugdenhil E, Van Heerikhuizen H. (1996) Functional characterization of a 5-HT<sub>2</sub> receptor cDNA cloned from a *Lymnaea stagnalis*. *Eur J Pharmacol* 311:249-258.
- Gerschenfeld HM (1973) Chemical transmission in invertebrate central nervous system and neuromuscular junctions. *Physiol Rev* 53:1-119.
- Gillette R, Davis WJ (1977) The role of the metacerebral giant neurone in the feeding behaviour of *Pleurobranchaea*. *J Comp Physiol* 116:129-159.
- Gillette R, Jing J (2001) The role of the escape swim motor network in the organization of behavioral hierarchy and arousal in *Pleurobranchaea*. *Am Zool* 41:983-992.
- Glennon RA, Dukat M, Westkaemper RB (2000) Serotonin receptor subtypes and ligands. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*
- Glusman S, Kravitz EA (1982) The action of serotonin on excitatory nerve terminals in lobster nerve-muscle preparations. *J Physiol* 325:223-241.
- Goldberg JI, Koehncke NI, Christopher KJ, Neumann C, Diefenbach TJ. (1994) Pharmacological characterization of a serotonin receptor involved in an early embryonic behavior of *Helisoma trivolvis*. *J Neurobiol* 25:1545-1557.
- Goldberg JI, Kater SB. (1989) Expression and function of the neurotransmitter serotonin during development of the *Helisoma* nervous system. *Dev Biol* 131:483-495.
- Granzow B, Kater SB (1977) Identified higher-order neurons controlling the feeding motor program of *Helisoma*. *Neurosci* 2:1049-1063.



- Granzow B, Rowell CHF (1981) Further observations on the serotonergic cerebral neurones of *Helisoma* (Mollusca, Gastropoda): the case for homology with the metacerebral giant cells. J Exp Biol 90:283-305.
- Green AR, Curzon G (1968) Decrease of 5-hydroxytryptamine in the brain provoked by hydrocortisone and its prevention by allopurinol. Nature 220:1095–1097.
- Green AR (2006) Neuropharmacology of 5-hydroxytryptamine. Br J Pharmacol 147:145-152.
- Hernádi L, Elekes K, S.-Rózsa K (1989) Distribution of serotonin-containing neuron in the central nervous system of the snail *Helix pomatia*. Cell Tissue Res 257:313-323.
- Hernádi L, (1992) Relationship between the distribution of serotonergic cell bodies and the running of vascular elements in the central nervous system of the snail *Helix pomatia*. Comp Biochem Physiol 103A, 85-92.
- Hernádi L, Erdélyi L, Hiripi L, Elekes K (1998) The organization of serotonin, dopamine, and FMRFamide containing elements and their possible role in the regulation of spontaneous contraction of the gastrointestinal tract in the snail, *Helix pomatia*. J Neurocytol 27:761-775.
- Hiripi L, S.-Rózsa K (1987) Alterations of the serotonin level in the central nervous system of *Locusta migratoria* during larval-adult transformation. Acta Biol Hung 38:195-202.
- Hiripi L, Salánki J, Zs.-Nagy I és Muskó I (1973) Subcellular distribution of biogenic monoamines in the central nervous system of *Anodonta cygnea* L. as revealed by density gradient centrifugation. J Neurochem 21: 791-797.
- Hiripi L, Elekes K (2010) A 5-HT<sub>1A</sub>-like receptor is involved in the regulation of the embryonic rotation of *Lymnaea stagnalis*. Comp Biochem Physiol C 152:57-61.
- Hochberg R (2007) Serotonin-like immunoreactivity in the central and peripheral neurons systems of the interstitial Acochlidae *Aspersina* sp. (Opisthobranchia). Biol Bull 213:43-54.
- Homberg U (1994) Distribution of neurotransmitters in the insect brain. Progress in Zoology, vol. 40. Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart

- Horner RL, Sanford LD, Annis D, Pack AI, Morrison AR (1997) Serotonin at the laterodorsal tegmental nucleus suppresses rapid- eye-movement sleep in freely behaving rats. *J. Neurosci* 17:7541–7552.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharm Biochem Behav* 71:533-554.
- Itoh MT, Igarashi J (1996) Circadian rhythm of serotonin levels in planaria. *Neuroreport* 11:473-476.
- Jaaro H, Beck G, Conticello SG, Fainzilber M. (2001) Evolving better brains: need for neurotrophins? *Trends Neurosci* 24:79-85.
- Jacobs BL, Azmitia EC (1992) Structure and function of the brain serotonin system *Physiol Rev* 72:165-229.
- Jiang J, Moroz LL, Gillette R (1998) Serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the marine molluscs *Pleurobranchaea californica* and *Tritonia diomedea*. *J Comp Neurol* 395:466-480.
- Jing J, Gillette R (1999) Central pattern generator for escape swimming in the notaspid sea slug *Pleurobranchaea californica*. *J Neurophysiol* 81:654-667.
- Jing J, Gillette R (2000) Escape swim network interneurons have diverse roles in behavioral switching and putative arousal in *Pleurobranchaea*. *J Neurophysiol* 83:1346–55.
- Jing J, Gillette R (2003) Directional avoidance turns encoded by single neurons and sustained by multifunctional serotonergic cells. *J Neurosci* 23:3039–51.
- Katz PS, Getting PA, Frost WN (1994) Dynamic neuromodulation of synaptic strength intrinsic to a central pattern generator circuit. *Nature* 367:729-731.
- Kadan MJ és Hartig PR (1988) Autoradiographic localization and characterization of [125I]lysergic acid diethylamide binding to serotonin receptors in *Aplysia* *Neuroscience*, 24:1089-1102
- Kiss T, Hernádi L, László Z, N. Fekete Zs, Elekes K. (2010) Peptidergic modulation of serotonin and nerve elicited responses of the salivary duct musculature in the snail, *Helix pomatia*. *Peptides* 31:1007–1018.

- Kemenes Gy, Elekes K, Hiripi L, Benjamin PR (1989) A comparison of four techniques for mapping the distribution of serotonin and serotonin-containing neurons in fixed and living ganglia of the snail, *Lymnaea*. *J Neurocytol* 18:193-208.
- Kemenes Gy, Benjamin PR (1989) Appetitive learning in snails shows characteristics of conditioning in vertebrates *Brain Res* 489:163-166.
- Kemenes G, Hiripi L, Benjamin PR (1990) Behavioral and biochemical-changes in the feeding system of *Lymnaea* induced by the dopamine and serotonin neurotoxins 6-hydroxydopamine and 5,6-dihydroxytryptamine. *Phil Trans R Soc Lond B* 329:243-255.
- Kent KS, Hoskins SG, Hildebrand JG (1987). A novel serotonin-immunoreactive neuron in the antennal lobe of the sphinx moth *Manduca sexta* persists throughout postembryonic life. *J Neurobiol* 18:451-465.
- Kerkut GA, Cottrell GA (1963) Acetylcholine and 5-hydroxytryptamine in the snail brain. *Comp Biochem Physiol* 8:53-63.
- Kesteren RE, Fainzilber M, Hauser G, Minnen J, Vreugdenhil E, Smit AB, Fibanez C, Geraerts WPM, Bulloch AGM (1998) Early evolutionary of the neurotrophin receptor family. *The EMBO Journal* 17:2534-2542.
- Klemm N, Huster R, Cantera R, Nässel DR (1986) Neurons reactive to antibodies against serotonin in the stomatogastric nervous system and in the alimentary control of locust and crickets *Neuroscience* 17:247-261
- Kloppenborg P, Erber J (1995) The modulatory effects of serotonin and octopamine in the visual system of the honeybee (*Apis mellifera* L.) II. Electrophysiological analysis of motion-sensitive neurons in the lobula. *J Comp Physiol A* 176:119-129.
- Kristan WB, Calabrese RL, Friesen WO (2005) Neural control of leech behavior. *Prog. Neurobiol* 76:279-327.
- Kupfermann I, Weiss KR (1981) The role of serotonin in arousal of feeding behavior of *Aplysia*. In: *Serotonin Neurotransmission and Behavior*, by Jacobs BE, Gelperin A, Cambridge: MIT, 255-287.
- Kupfermann I (1991) Functional studies on cotransmission. *Physiol Rev* 71:683-732.

- Kyriakides M, McCrohan CR (1989) Effect of putative neuromodulators on rhythmic buccal motor output in *Lymnaea stagnalis*. J Neurobiol 20:635-650.
- Leatherbarrow, (1992) GraFit Version 3.0 Erithacus Software Ltd., Staines, UK.
- Lehman HK, Greenberg MJ (1987) The actions of FMRFamide-like peptides on visceral and somatic muscles of the snail *Helix aspersa*. J Exp Biol 131:55-68.
- Lent CM, Zundel D, Freedman E, Groome JR (1991) Serotonin in the leech central nervous system: anatomical correlates and behavioral effects. J Comp Physiol A 168:191-200.
- Li J-L, Kaneko T, Nomura S, Li Y-Q, Mizuno N (1997) Association of serotonin-like immunoreactive axons with nociceptive projection neurons in the caudal spinal trigeminal nucleus of the rat. J Comp Neurol 384:127–141.
- Li XC, Giot JF, Kuhl D, Hen R, Kandel ER (1995) Cloning and characterization two related serotonergic receptors from the brain and the reproductive system of *Aplysia* that activate phospholipase C. J. Neuroscience 15:7585-7591.
- Ludwig C, Schmidt A (1869) Das Verhalten der Gase, welche mit dem Blut durch den reizbaren Säugetiermuskel strömen. Arb Physiol Anstalt Leipzig, 3:1.
- Lutz EM, Tyrer NM (1988) Immunohistochemical localization of serotonin and choline acetyltransferase in sensory neurons of the locust. J Comp Neurol 267:335-42.
- Mackey SL, Kandel ER, Hawkins RD (1989) Identified serotonergic neurons LCB1 and RCB1 in the cerebral ganglia of *Aplysia* produce presynaptic facilitation of siphon sensory neurons. J Neurosci 9:4227–35.
- Maddrell SHP, Phillis JE (1975) Secretion of hypo-osmotic fluid by the lower Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus*. J Exp Biol 62:671-3..
- Mapara S, Parries S, Quarrington C, Ahn KC, Gallin WJ, Goldberg JI (2008) Identification molecular structure and expression of two cloned serotonin receptors from the pond snail, *Helisoma trivolvis*. J Exp Biol 211:900-910.
- Marois R, Croll RP (1992) Development of serotoninlike immunoreactivity in the embryonic nervous system of the snail *Lymnaea stagnalis* J Comp Neurol 322:255-265.

- Marois R, Carew TJ (1997a) Fine structure of the apical ganglion and its serotonergic cells in the larva of *Aplysia californica*. *Bio Bull* 192:388–398.
- Marois R, Carew TJ (1997b) Ontogeny of serotonergic neurons in *Aplysia californica*. *J Comp Neurol* 386:477–490.
- Marois R és Carew TJ (1997c) Projection patterns and target tissues of the serotonergic cells in larval *Aplysia californica*. *J Comp Neurol* 386:491–506.
- Marshall CG, Lent CM (1988) Excitability and secretory activity in the salivary gland cells of jawed leeches (*Hirudinea: Gnathobdellida*). *J Exp Biol* 137:89-105.
- Matsutani T, Nomura T (1986) Serotonin-like immunoreactivity in the central nervous system and gonad of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Cell Tissue Res* 244:515-517.
- McCaman MW, Ono JK, McCaman RE (1984) 5-Hydroxytryptamine measurements in molluscan ganglia and neurons using a modified radioenzymatic assay. *J Neurochem* 43:91-9.
- McCrohan CR, Benjamin PR (1980b) Synaptic relationship of the cerebral giant cells with motoneurons in the feeding system of *Lymnaea stagnalis*. *J Exp Biol* 85:169-186.
- McCrohan CR, Audesirk TE (1987) Initiation, maintenance and modification of patterned buccal motor output by the cerebral giant cells of *Lymnaea stagnalis* *Comp Biochem Physiol A* 87:969-977.
- McKenzie JD, Counce M, Hetherington MS, Winlow W (1998) Serotonergic innervation of the foot of the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L). *J Neurocytol* 27:459-470.
- McPherson DR, Blankenship JE (1991) Neural control of swimming in *Aplysia brasiliana*. III. Serotonergic modulatory neurons. *J Neurophysiol* 66:1366-1379.
- Mescheryakov VN (1990) The common pond snail *Lymnaea stagnalis* In: Detlaff DA, Vassetzky SG, Animal species for developmental studies. Plenum Press, NewYork, London, pp. 69-132.
- Messenger JB (1996) Neurotransmitters in cephalods. *Invertebr Neurosci* 2:95-114.

- Morill JB (1982) Development of pulmonate gastropod, *Lymnaea*. In: Harrison FW, Cowden RR, Developmental Biology of Freshwater Invertebrates. Alan P. Liss, New York, pp. 399-483.
- Moroz LL, Sudlow LC, Jing J, Gillette R (1997) Serotonin-immunoreactivity in peripheral tissues of the opisthobranch mollusc *Pleurobranchaea californica* and *Tritonia diomedea*. J Comp Neurol 382:176-188.
- Nagy T, Elekes K (2000) Embryogenesis of the central nervous system of the pond snail, *Lymnaea stagnalis* L. An ultrastructural study. J Neurocytology 29:43-60.
- Nässel DR, Klemm N (1983) Serotonin-like immunoreactivity in the optic lobes of three insect species. Cell Tissue Res 232:129-140.
- Nässel DR, Elekes K (1985) Serotonergic terminals in the neuroal sheath of the blowfly nervous system: ultrastructural immunocytochemistry and 5,7-dihydroxytryptamine labelling Neuroscience 15:293-307.
- Nässel DR (1988) Serotonin and serotonin-immunoreactive neurons in the nervous system of insects Prog Neurobiol, 30:1-85.
- Nässel DR (2009) Neuropeptide signaling near and far: how localized and timed is the action of neuropeptides in brain circuits? Invert Neurosci 9:91-100.
- Naumenko EV, Popova NK (1975) Serotonin and melatonin in the regulation of endocrines. Nauka, Novosibirsk, (in Russian)
- Nelson TJ, Alkon DL (1997) Biochemistry of molluscan learning and memory. Bioassays 19:1045-1053.
- Ono JK, McCaman RE (1984) Immunocytochemical localization and direct assays of serotonin-containing neurons in *Aplysia*. Neurosci 11:549-560.
- Page LR, Parries SC (2000) Comparative study of the apical ganglion in planktotrophic caenogastropod larvae: ultrastructure and immunoreactivity to serotonin. J Comp Neurol 418:383-401.
- Parent A (1984) Functional anatomy and evolution of monoaminergic systems. Amer Zool 24:783-790.

- Pauwels PJ (2003) 5-HT receptors and their ligands. Tocris Reviews No. 25, Tocris Cookson, Bristol
- Pentreath VW, Berry MS, Osborne NN (1982) The serotonergic cerebral cells in gastropods. Biology of serotonergic transmission. Chichester: John Wiley and Sons. pp. 457-513.
- Peroutka JS (1994) 5-Hydroxytryptamine receptors in vertebrates and invertebrates: Why are there so many? Neurochem. Int. 25:533-536.
- Peroutka JS, Snyder SH (1979) Multiple serotonin receptors; differential binding of [ $H^3$ ] 5-Hydroxytryptamine, [ $H^3$ ] lysergic acid diethylamide and [ $H^3$ ] spiroperidol. Mol Pharmacol 16:687-699.
- Peyron C, Petit JM, Rampon C, Jouvet M, Luppi PH (1997) Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. Neuroscience 82:443-468.
- Pinchasov Y, Fancher BI, Burke WH, Jensen LS (1989) Glycolic acid and tryptophan effects on feed intake and hypothalamic indoleamines in chicks. Physiol & Behav 45:585-589.
- Prasada RPD, Jadhao AG, Sharma SC (1987) Descending projection neurones to the spinal cord of the goldfish, *Carassius auratus*. J Comp Neurol 265:96-108.
- Randall DW, Burggren French K (2002) Eckert animal physiology: mechanisms and adaptations. 5th ed. W. H. Freeman and Co., New York. 736 pp.
- Rapport MM (1949). Serum vasoconstrictor (serotonin) V. The presence of creatinine in the complex: a proposed structure of the vasoconstrictor principle. J Biol Chem, 180:961-969.
- Raven CP (1966) Morphogenesis: The analysis of molluscan development. Pergamon Press, Oxford
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol 17:208-212.
- Rose , Benjamin, (1979) The Relationship of the Central Motor Pattern to the Feeding Cycle of *Lymnaea Stagnalis* J Exp Biol



- Sadamoto H, Serfozo Z, Ito E (2008) Localization of serotonin transporter mRNA in the CNS of *Lymnaea stagnalis*. *Acta Biol Hung*. 2008;59 Suppl:61-4.
- Salecker I, Distler P (1990) Serotonin-immunoreactive neurons in the antennal lobe of the American cockroach *Periplaneta americana*: light- and electron- microscopic observations. *Histochem*: 94:463-473.
- Satterlie RA, Norekian TP, Jordan S, Kazilek CJ (1995) Serotonergic modulation of swimming speed in the pteropod mollusc *Clione limanica* I. Serotonin immunoreactivity in the central neurons system and wings. *J Exp Biol* 198:895-904.
- Satterlie RA, Norekian TP (1996) Modulation of swimming speed in the pteropod mollusc *Clione limacina*: role of a compartmental serotonergic system. *Invert Neurosci* 2:157-165.
- Saudou F, Hen R (1994) 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes in vertebrates and invertebrates. *Neurochem Int* 6:503-32.
- Serfőző Z, Szentmiklósi J, Elekes K. (2008) Characterization of nitrenergic neurons in the alimentary tract in the snail, *Helix pomatia*, L. An immunocytochemical and physiological study. *J Comp Neurol* 506:801-821.
- Shepherd GM (1988) *Neurobiology*, 2<sup>nd</sup> Edn. Oxford: Oxford University Press.
- Simonszky KJ (1996) Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behav. Brain Res* 73:32-42.
- Sloley BD (2004) Metabolism of monoamines in invertebrates: the relative importance of monoamine oxidase in different phyla. *Neurotoxicology* 25:175-183.
- S.Rózsa K (1984) The pharmacology of molluscan neurons. *Prog Neurobiol* 23:79-150.
- Stefano BG, Zhao X, Bailey D, Metlay M, Leung MK (1989) High affinity dopamine binding to mouse thymocytes and *Mytilus edulis* (bivalvia) hemocytes. *J Neuroimmunol* 21:76-74.
- Steinbusch HWM, Mulder AH (1984) Serotonin-immunoreactive neurons and their projections in the CNS. *Handbook of Chemical Neuroanatomy, Classical Transmitters and Transmitter receptors in the CNS*, Vol. 3. Part II. Elsevier, Science Publishing, New York

- Straub VA, Benjamin PR (2001) Extrinsic modulation and motor pattern generation in a feeding network: a cellular study. *J Neurosci* 21:1767-1778.
- Sudlow LC, Jing J, Moroz LL, Gillette R (1998) Serotonin immunoreactivity in the central nervous system of the marine molluscs *Pleurobrachaea californica* and *Tritonia diomedea*. *J Comp Neurol* 395:466-480.
- Sugamori KS, Sunahara RK, Guan HC, Bulloch AG, Tensen CP, Seeman P, Niznik HB, Van Tol HH (1993) Serotonin receptor cDNA cloned from *Lymnaea stagnalis*. *Proc Nat Acad Sci USA* 1:11-15.
- Syed NI, Harrison D, Winlow W (1988) Locomotion in *Lymnaea* – role of serotonergic motoneurons controlling the pedal cilia. *Symposia Biologica Hungarica* 36:387-402.
- Tierney AJ (2001) Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review. *Comp Biochem and Physiol A*: 128:791-804.
- Tuersley MD, McCrohan CR (1988) Serotonergic modulation of patterned motor output in *Lymnaea stagnalis*. *J Exp Biol* 135:473-486.
- Twarog BM, Page IH (1953) Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol* 175:157-161.
- Twarog BM (1954) Responses of a molluscan smooth muscle to acetylcholine and 5-hydroxytryptamine. *J Cell Physiol* 44:141-163.
- Uemura T, Yamashita T, Haga C, Miyazaki N, Kondo H, Matsushita M (1987) Localization of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of *Octopus vulgaris* by immunohistochemistry. *Brain Res* 406:73-86.
- Vilim FS, Price DA, Lesser W, Kupfermann I, Weiss K (1996a) Costorage and corelease of modulatory peptide containing cotransmitters with partially antagonistic actions on the accessory radula closer muscle of *Aplysia californica*. *J Neurosci* 16:8092-8104.
- Vilim FS, Cropper EC, Price DA, Kupfermann I, Weiss K (1996b) Release of peptide cotransmitters in *Aplysia*: Regulation and functional implications. *J Neurosci* 16:8105-8114.

- Virkkunen M, Goldman D, Nielsen DA, Linnoila M (1995) Low brain serotonin turnover rate (low CSF 5-HIAA) and impulsive violence. *J Psychiatry Neurosci* 20:271-275.
- Vízi ES (1984) Non-synaptic interaction between neurons: modulation of neurochemical transmission. Chichester, New York:Wiley.
- Vízi ES, Kiss JP (1998) Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter system: synaptic and non-synaptic interactions. *Hippocampus* 8:566-607.
- Vízi ES, Fekete A, Karoly R, Mike A (2010) Non-synaptic receptors and transporters involved in brain functions and targets of drug treatment. *J. Pharmacol.* [Epub ahead of print]
- Voronezhskaya EE, Hiripi L, Elekes K, Croll RP (1999) Development of catecholaminergic neurons in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*: I. Embryonic development of dopamine-containing neurons and dopamine-dependent behaviours. *J Comp Neurol* 404:285-296.
- Walcourt-Ambakedermo A és Winlow W (1994a) 5-HT receptors on identified *Lymnaea* neurones in culture: pharmacological characterization of 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Comp Biochem Physiol* 107:129-141
- Walcourt-Ambakedermo A és Winlow W (1994b) 5-HT receptors on identified *Lymnaea* neurones in culture: pharmacological characterization of 5-HT<sub>2</sub> receptors *Gen Pharmacol* 25:1079-1092
- Walcourt-Ambakedermo A és Winlow W (1995) 5-HT receptors on identified *Lymnaea* neurones in culture: pharmacological characterization of 5-HT<sub>3</sub> receptors *Gen Pharmacol* 26:553-561
- Walker RJ (1986) Transmitters and modulators In: Willows AOD, The Mollusca. New York: Academic Press. pp. 279-485.
- Walker RJ, Hedges A, Woodruff GN (1986) The pharmacology of the neurones of the *Helix aspersa*. *Symp Zool Soc London* 22:33-74.
- Walker RJ, Brooks HL, Holden-Dye L (1996) Evolution and overview of classical transmitter molecules and their receptors. *Parasitology* 113:S3-S33.
- Wallen P, Buchanan JT, Grillner S, Hill RH, Christenson J, Hokfelt T (1989) Effects of 5-hydroxytryptamine on the after hyperpolarization, spike frequency regulation, and

- oscillatory membrane properties in lamprey spinal cord neurons. *J Neurophysiol* 61:759-768.
- Walters ET (1991) A functional, cellular and evolutionary model of nociceptive plasticity in *Aplysia* *Biol Bull* 160:241-251.
- Weiss KR, Cohen JL, Kupfermann I (1978) Modulatory control of buccal musculature by serotonergic neuron (metacerebral cell) in *Aplysia*. *J Neurophysiol* 41:181-203.
- Welsh JH (1953) Excitation of the heart of *Venus mercenaria*. *Arch exp Path Pharmacol* 219:23-29.
- Welsh JH (1957) Serotonin as possible neurohumoral agent: evidence obtained in lower animals. *Ann. NY. Acad Sci* 48:618-630.
- Welsh JH, Moorhead M (1960) The quantitative distribution of 5-hydroxytryptamine in the invertebrates, especially in their nervous systems. *J Neurochem* 6:146-169.
- Willard AL (1981) Effects of serotonin on the generation of the motor program for swimming by the medicinal leech. *J Neurosci* 1:936-944.
- Witz P, Amlaiky N, Plassat JL, Maroteaux L, Borrelli E, Hen R (1990) Cloning and characterization of *Drosophila* serotonin receptor that activates adenylate cyclase. *Proc Nat Acad Sci, USA* 87:8940-4.
- Yamanaka M, Hatakeyama D, Sadamoto H, Kimura T, Ito E (2000) Development of key neurons for learning stimulates learning ability in *Lymnaea stagnalis*. *Neurosci Lett* 278:113-116.
- Yeoman MS, Kemenes G, Benjamin PR, Elliott CJH. (1994a) Modulatory role for the serotonergic cerebral giant cells in the feeding system of the snail, *Lymnaea* II: photoinactivation. *J Neurophysiol* 72:1372-1382.
- Yeoman MS, Brierley MJ, Benjamin PR (1996) Central pattern generator interneurons are targets for the modulatory serotonergic cerebral giant cells in the feeding system of *Lymnaea*. *J Neurophysiol* 75:11-25.
- Yuan Q, Lin F, Zheng X, Sehgal A (2005) Serotonin modulates circadian entrainment in *Drosophila*. *Neuron* 47:115-127.

## 11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik segítsége nélkül nem jöhetett volna létre ez a disszertáció.

Mindenekelőtt szüleimnek tartozom hálával és köszönettel, hogy hosszú iskolai tanulmányaim során mindvégig támogattak és minden áldozatot vállaltak azért, hogy céljaimat megvalósíthassam.

Őszinte köszönettel tartozom Elekes Károlynak, témavezetőmnek, a Magyar Tudományos Akadémia Balatoni Limnológiai Kutatóintézet tudományos tanácsadójának, Prof. Úrnak, aki szakmai dolgokon túl, a magánéletben is maximálisan támogatott. Segített a disszertációm alapját képező immunhisztokémiai és elektronmikroszkópos technikák alkalmazás szintű elsajátításában, a munkák kivitelezésében, az eredmények kiértékelésében és azok közzétételében egyaránt. Köszönöm neki, hogy minden szinten egyengette tudományos karrierem és kőkemény kritikussom volt, anatómus pontossággal javította kézírataimat, megmutatta hogyan kell 44 betűt úgy egymás mögé tenni, hogy tartalmas disszertáció születhessen.

Hálásan köszönöm minden kollegámnak a munkám során nyújtott segítségét. Mindenek előtt ki szeretném emelni a sorból Hiripi László tudományos főmunkatársat, aki nélkül a biokémiai mérések nem jöhettek volna létre. Köszönettel tartozom Elena Voronezhskayának a farmakológiai kísérletekben, valamint Specziár András tudományos igazgatóhelyettesnek a statisztikai kiértékelésekben nyújtott segítségéért. Köszönetem fejezem ki Nagyné Fekete Zsuzsa asszisztensnek, akitől pótolhatatlan segítséget kaptam a mindennapi kutatómunka során. Köszönet Serfőző Zoltánnak, Hernádi Lászlónak és Takács Bréla Péternek, akik készségesen meghallgatták szakmai problémáimat és igyekeztek hasznos tanácsokkal segítségemre lenni. Köszönöm Balázs Boldizsár számítógéppel kapcsolatos segítségét.

Köszönettel tartozom Toldi József és Fekete Éva tanszékvezető egyetemi tanároknak, akik egyetemi éveim alatt világszemléletükkel megszeretették velem az élettant, a neuro- és a fejlődésbiológiát.

Végül, de nem utolsósorban, szeretném köszönetem kifejezni Bíró Péternek, a Magyar Tudományos Akadémia Balatoni Limnológiai Kutatóintézet igazgatójának, hogy bizalmat szavazott meghosszabításommal és lehetőséget biztosított a disszertációm elkészítéséhez.